

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID
Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Alimentaria y de
Biosistemas



**Comparativa del proceso de patogénesis
inducido por luz de las especies de
Monilinia que infectan al melocotón en
España**

TESIS DOCTORAL

Presentada para optar al título de Doctor por:

Juan Diego Astacio Rosado

Graduado en Biología

Máster en Biología Avanzada: Investigación y Aplicación

Madrid, 2024



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID
Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica,
Alimentaria y de Biosistemas

**Doctorado en Biotecnología y Recursos Genéticos de Plantas
y Microorganismos Asociados**

**Comparativa del proceso de patogénesis
inducido por luz de las especies de
Monilinia que infectan al melocotón en
España**

TESIS DOCTORAL

Presentada para optar al título de Doctor por:

Juan Diego Astacio Rosado

Graduado en Biología

Máster en Biología Avanzada: Investigación y Aplicación

Bajo la dirección de:

Dra. Antonieta De Cal y Cortina

Dr. Eduardo Antonio Espeso Fernández

Madrid, 2024

Título: Comparativa del proceso de patogénesis inducido por luz de las especies de Monilinia que infectan al melocotón en España

Autor: Juan Diego Astacio Rosado

Programa de Doctorado: Doctorado en Biotecnología y Recursos Genéticos de Plantas y Microorganismos Asociados

Dirección de tesis:

Dra. Antonieta De Cal y Cortina Profesor de Investigación OPIs. Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, CSIC.

Dr. Eduardo Antonio Espeso Fernández Investigador Científico OPIS. Centro de Investigaciones Biológicas Margarita Salas, CSIC.

Revisores externos:

Tribunal de tesis:

Fecha de defensa:

Esta tesis ha sido financiada por las ayudas PID2020-115702RB468

C21/AEI/10.13039/501100011033; PID2021-124278OB-I00/MCIN/AEI/10.13039/

501100011033/FEDER, UE, y AGL2017-84389-C2-2-R de (MINECO/AEI/FEDER, UE).

Juan Diego Astacio ha recibido una ayuda para contratos predoctorales PRE2018-085721 del Ministerio de Ciencias, Innovación y Universidades.

A mi familia, que siempre me ha apoyado en todo.

Agradecimientos

Durante los años que ha durado esta aventura he tenido la oportunidad de sentirme agradecido muchas veces, y con tanta gente que me va a ser imposible acordarme de todos.

Para empezar, gracias a Antonieta, por acogerme en su grupo, darme la oportunidad de sumergirme en un mundo tan apasionante como es la investigación, y saber guiarme por él con paciencia y cariño. Gracias por apoyarme y creer en mí durante estos años, y por estar siempre disponible cuando he tenido dudas. Quiero dar las gracias a Eduardo por aceptar co-tutorizar mi tesis, aportando una visión y una forma de ver y hacer ciencia únicas, de las que he aprendido muchísimo, además de salvarme la vida en innumerables ocasiones. Esta tesis ha sido posible gracias a la labor conjunta de mis dos tutores, a su guía, ayuda y dedicación.

Tengo mucho que agradecer también a todo el equipo del grupo de Hongos Fitopatógenos, empezando por Inmaculada, que fue la primera persona a la que contacté para solicitar la FPI y que nos ayudó a Elena y a mí a poder realizar nuestro sueño. A Yolanda, María y Belén, gracias por vuestro apoyo y compañía durante estos años, habéis conseguido que me sintiese como en casa en Madrid y en el laboratorio. A Elena, que se aventuró en esto del doctorado junto a mí, y que durante 4 años ha compartido conmigo lo bueno, alegrándose y celebrando los logros, y lo malo, ofreciendo su apoyo y su consejo sin pensarlo dos veces. Yo sólo espero haber sido la mitad de buen compañero para ti de lo que tú lo has sido para mí.

Agradecer también a los integrantes del departamento de Protección Vegetal, así como a todo el personal del INIA, que siempre me han prestado ayuda y apoyo cuando lo he necesitado, ya sea con reactivos o equipos para los experimentos, o solucionando cualquier problema de gestión que haya podido surgir.

Quiero agradecer también a todas las personas que consiguieron que me sintiese en Madrid como en casa, empezando por Rebecca, la mejor compañera de piso que existe. Me abriste las puertas de tu casa y conseguiste que la sintiese mía. También a Nuria, que tras tu paso por el grupo como estudiante te quedaste como una amiga con la que siempre puedo contar. A mi grupo de alcalareños por Madrid, Miguel, Cayetano, Julio y Germi, me trajisteis un pedacito de casa a Madrid.

Por último, quiero agradecer a quienes me han dado ánimos y mostrado su apoyo en la distancia, empezando por mi familia. Mamá, papá, Adriana, soy quien soy y he conseguido todo lo que me he propuesto gracias a vosotros. Muchísimas gracias también a Alex, Deyanira y Carmen, que siempre se habéis preocupado por mí y he podido contar con vosotros todas las veces que lo he necesitado.

Y por supuesto, gracias a Carmen, mi compañera de viaje. No me puedo imaginar qué hubiera sido de mí sin tu compañía, ayuda y cariño durante estos años. Gracias por aguantarme cuando ni yo mismo era capaz de hacerlo y no rendirte nunca, a pesar de la distancia. Este logro es tan mío como tuyo.

A todos vosotros, gracias.

Abstract

Brown rot is the main fungal disease affecting stone fruit crops worldwide. It is caused by fungi of the genus *Monilinia*, which are a filamentous fungi from the *Sclerotiniaceae* family with a necrotrophic lifestyle. They employ a number of virulence factors to penetrate the plant cell wall and membranes. The development of brown rot is controlled by environmental factors and the maturity stage of the host. In recent years, lighting conditions are gaining relevance as an environmental factor that can modify the course of development of the disease caused by *Monilinia* spp.

The aim of this thesis is to study how different wavelengths and photoperiods affect the host-pathogen-environment interaction. For this purpose, molecular and bioinformatics techniques were used to identify the photoinducible genes, as well as those coding for virulence factors and photoreceptors in each *Monilinia* species. Growth assays were performed on different synthetic liquid media in addition to infection assays on fruit to quantify the effect of different wavelengths and photoperiods on fungal growth, disease development, and fungal transcriptional response.

The three *Monilinia* species encode a very similar set of CAZymes in their respective genomes. A total of 414, 398, and 383 CAZymes were identified in the genomes of *M. fructicola* 38C, *M. laxa* 8L, and *M. fructigena* Mgena6, respectively. In addition, two genes coding for NEP1-like toxins were found in the genomes of the three *Monilinia* species. Red and blue lights caused an increase in the transcriptional activity of *M. fructicola* 38C virulence factors during the first hours of the infection process on nectarine, which was accompanied by a reduction of the latency period of the disease. In the case of *M. laxa* 8L, fewer genes also experienced photoinduction by red light. In *M. fructigena* Mgena6 photoinduction was residual, while some virulence factors saw their gene expression levels increased under dark conditions. No light-caused differences in the development of disease symptoms under our experimental conditions were observed in either *M. laxa* or *M. fructigena*. On the other hand, *M. fructicola* 38C showed differences in gene expression levels of CAZymes and *Mfcnep2* when grown on different synthetic culture media and on fruit.

There are differences in daily growth rate and sporulation at the species level when the fungus is grown on solid medium and illuminated by different types of light

and photoperiods. Red light produced an increase in the daily growth rate in *M. fructicola* 38C, while all other wavelengths reduced it. *M. fructigena* Mgena6 showed a reduction in growth rate in response to all wavelengths under a short photoperiod, while under a long photoperiod white, green and near ultraviolet lights reduced it significantly. All three *Monilinia* species have in their genome information to encode the same set of photoreceptor proteins. This set is composed of three phytochromes, two cryptochromes, three LOVs, and two rhodopsins.

This thesis shows the existence of mechanisms that allow differential regulation by light of disease development and virulence factors in each species. Despite having identical photoreceptor machinery, we observed differences in light-responsive behavior among the three *Monilinia* species, including an increase in the rate of appearance of brown rot symptoms by *M. fructicola* 38C and increased transcriptional activity of several virulence factors.

Resumen

La podredumbre parda es una de las principales enfermedades fúngicas que afecta al cultivo de fruta de hueso en todo el mundo. Está causada por hongos del género *Monilinia* de la familia *Sclerotiniaceae*, con un estilo de vida necrotrofo, que emplea una serie de factores de virulencia para atravesar la pared y membranas celulares vegetales y causar la muerte de éstas para alimentarse de su contenido. El desarrollo de la podredumbre parda está controlado por factores ambientales y el estado de maduración del huésped. En los últimos años las condiciones de iluminación están cobrando relevancia como factor ambiental que puede alterar el desarrollo de la enfermedad causada por *Monilinia* spp.

Esta tesis se plantean cuatro objetivos para estudiar cómo afectan distintas longitudes de onda y fotoperiodos a la interacción huésped-patógeno-ambiente. Para ello, se usaron técnicas moleculares y bioinformáticas para identificar los genes fotoinducibles, así como los codificantes para factores de virulencia y fotorreceptores en cada especie de *Monilinia*. Se realizaron ensayos de crecimiento sobre distintos medios líquidos sintéticos además de ensayos de infección sobre nectarina para poder cuantificar el efecto de distintas longitudes de onda y fotoperiodos en el crecimiento del hongo, desarrollo de la enfermedad, y en la respuesta transcripcional del hongo.

Las tres especies de *Monilinia* codifican en sus respectivos genomas un set de CAZymes muy similar. Se identificaron un total de 414, 398 y 383 CAZymes en los genomas de *M. fructicola* 38C, *M. laxa* 8L y *M. fructigena* Mgena6, respectivamente. Además, en el genoma de las tres especies de *Monilinia* se localizan dos genes codificantes para toxinas NEP1-like. Las luces roja y azul provocaron un aumento en la actividad transcripcional de los genes *Mfcpme3*, *Mfcpme2*, *Mfcpg1*, *Mfcell1*, *Mfcpnl1*, *Mfcpnl2* y *Mfcnep2* en *M. fructicola* 38C durante las primeras horas del proceso de infección sobre nectarina, lo cual vino acompañado por una reducción del periodo de latencia de la enfermedad. En el caso de *M. laxa* 8L, una menor cantidad de genes también experimentaron fotoinducción por luz roja. En *M. fructigena* Mgena6 la fotoinducción fue residual, mientras que algunos factores de virulencia vieron sus niveles de expresión génica aumentados en condiciones de oscuridad. No se observaron diferencias causadas por luz en el desarrollo de síntomas de la enfermedad en *M. laxa* ni *M. fructigena*. Por otro lado, *M. fructicola* 38C mostró diferencias en los niveles de expresión génica de CAZymes y *Mfcnep2* al crecer sobre distintos medios de cultivo sintético y sobre fruta.

Existen diferencias en la tasa de crecimiento diario y esporulación a nivel de especie cuando el hongo crece sobre medio sólido y es iluminado por diferentes tipos de luz y fotoperiodos. La luz roja produjo un aumento en la tasa de crecimiento diario en *M. fructicola* 38C, mientras que el resto de longitudes de onda la redujeron. *M. fructigena* Mgena6 mostró una reducción de la velocidad de crecimiento en respuesta a todas las longitudes de onda bajo un fotoperiodo corto, mientras que en el fotoperiodo largo las luces blanca, verde y ultravioleta cercano la redujeron de forma significativa. Las tres especies de *Monilinia* tienen en su genoma información para codificar proteínas fotorreceptoras. Esta batería está compuesta por tres fitocromos, dos criptocromos, tres proteínas LOVs, y dos rodopsinas.

Esta tesis muestra la existencia de mecanismos que permiten la regulación diferencial por luz del desarrollo de la enfermedad y los factores de virulencia en cada especie. A pesar de contar con una maquinaria fotorreceptora idéntica, observamos diferencias en el comportamiento en respuesta a luz entre las tres especies de *Monilinia*, entre las que se incluyen un aumento en la velocidad de aparición de síntomas de podredumbre parda por parte de *M. fructicola* 38C y el aumento de actividad transcripcional de una serie de factores de virulencia.

Tabla de contenido

Agradecimientos	v
Abstract	vii
Resumen	ix
Lista de Figuras	xiv
Lista de Tablas	xvii
1. Introducción	1
1.1. Podredumbre parda causada por <i>Monilinia</i> spp. en <i>Prunus persica</i>	1
1.2. <i>Prunus persica</i>	1
1.3. Podredumbre parda	3
1.4. Agentes causales de la podredumbre parda	5
1.4.1. Identificación y distribución	5
1.4.2. Morfología y ciclo de vida del patógeno	7
1.4.3. Proceso de infección del agente patógeno	9
1.5. Factores de virulencia	11
1.5.1. CAZymes	12
1.5.2. NEPs y otras toxinas.	13
1.6. Condiciones ambientales para el desarrollo de la podredumbre parda	15
1.6.1. Temperatura	15
1.6.2. Humedad	16
1.6.3. Luz	18
2. Objetivos	27
3. Metodología	28
3.1. Material biológico	28
3.1.1. Cepas de <i>Monilinia</i> spp.	28
3.1.2. Fruto huésped	28
3.2. Condiciones de crecimiento	28
3.3. Condiciones de iluminación	29
3.4. Ensayos de crecimiento y esporulación	30
3.5. Ensayos de infección sobre fruta	30
3.6. Ensayos de expresión génica en distintos medios de cultivo	31
3.7. Análisis de expresión génica	32

3.7.1.	Extracción de ácidos nucleicos	32
3.7.2.	RT-qPCR.....	32
3.7.3.	RNaseq.....	34
3.8.	Herramientas bioinformáticas.....	34
3.8.1.	Predicción de proteomas.....	34
3.8.2.	Anotación funcional de Gene Ontology e identificación de genes de interes.....	34
3.8.3.	Construcción de arbol filogenético	35
3.8.4.	Análisis transcriptómicos de expresión diferencial	35
3.8.5.	Análisis de de enriquecimiento en términos GO	36
3.8.6.	Diseño de cebadores	36
3.8.7.	Visualización y predicción de estructuras 3D.....	36
3.8.8.	Comparativa de ORFs y promotores	37
3.9.	Análisis estadístico	37
3.10.	Metodología específica para cada uno de los objetivos	37
4.	Resultados	42
4.1.	Efecto de la luz sobre el desarrollo de la enfermedad y el crecimiento de la especie <i>Monilinia fructicola</i> y sus fotorreceptores.	42
4.1.1.	Efecto de la luz en la tasa de crecimiento y esporulación de <i>M. fructicola</i>	42
4.1.2.	Maquinaria de detección de luz en <i>M. fructicola</i> 38C.	44
4.1.3.	Perfiles transcripcionales en luz y oscuridad en <i>M. fructicola</i>	47
4.1.4.	Fotorregulación de genes fotorreceptores en <i>M. fructicola</i>	50
4.1.5.	<i>far1</i> , un pequeño gen codificador de proteínas regulado al alza durante la exposición a la luz.	51
4.1.6.	Análisis de expresión diferencial mediante RT-qPCR en <i>M. fructicola</i>	54
4.2.	Efecto de la luz roja sobre la podredumbre parda causada por <i>Monilinia fructicola</i> e identificación de genes relacionados con la patogenicidad: la familia CAZyme y las toxinas formadoras de poros.....	56
4.2.1.	Las luces roja y azul modifican el crecimiento micelial y la formación de conidias sobre PDA.....	56
4.2.2.	La luz roja y azul aumentan la velocidad de desarrollo de la enfermedad en nectarinas	58
4.2.3.	Impacto de la luz roja y azul en la regulación de los genes implicados en el proceso de degradación de la pared celular en la fruta y en el medio sintético	59
4.2.4.	La luz roja y azul inducen la expresión de la proteína nep1-like NEP2 durante las primeras etapas de la infección.....	62
4.3.	Efecto de la luz sobre la patogénesis de <i>Monilinia fructigena</i> . Base genética de la respuesta a la luz.....	63
4.3.1.	La luz blanca no afectó el desarrollo temprano de la enfermedad, pero influyó en la regulación transcriptómica	63
4.3.2.	Los genes diferencialmente expresados (DEGs) de <i>M. fructigena</i> Mgena6 durante el proceso de infección en respuesta a la luz están asociados con el metabolismo de carbohidratos.....	65

4.3.3.	La expresión génica de <i>M. fructigena</i> Mgena6 disminuye después de 14 horas de exposición a luz blanca	67
4.3.4.	Influencia de la luz blanca en la expresión génica de CWDEs	69
4.3.5.	Influencia de la luz en los genes asociados a la respuesta a luz en <i>M. fructigena</i> Mgena6.....	71
4.3.6.	Validación de los datos mediante RT-qPCR.....	72
4.4.	Comparativa del comportamiento de las tres principales especies de <i>Monilinia</i> en huertos de España en los procesos tempranos de infección sobre nectarina	74
4.4.1.	Influencia de diferentes longitudes de onda de luz en la tasa de crecimiento de <i>M. fructicola</i> y <i>M. fructigena</i>	74
4.4.2.	Diferencias en el complejo de fotorrecepción entre especies de <i>Monilinia</i>	76
4.4.3.	Anotación GO e identificación de CAZymes y CWDEs.....	78
4.4.4.	La luz roja influye en la expresión de los CAZymes en las especies de <i>Monilinia</i>	79
4.4.5.	Miembros de la familia NLP en el genoma de <i>Monilinia</i> spp.	82
4.4.6.	La luz roja causa sobreexpresión de <i>nep2</i> en <i>M. fructicola</i> 38C y <i>M. laxa</i> 8L	88
5.	Discusión	93
6.	Conclusiones	112
7.	Referencias	114
	Anexos	138

Lista de Figuras

Figura 1.1. Estructura básica de un fruto de melocotón, tipo drupa	2
Figura 1.2. Podredumbre en frutos de melocotón	3
Figura 1.3. Detalle al microscopio óptico del proceso de infección por <i>Monilinia</i> de una nectarina.	4
Figura 1.4. Detalle al microscopio óptico del micelio y conidias de <i>Monilinia</i> spp. (A) y (B) Cadena de conidias de <i>Monilinia</i> spp. (C) Formación de conidias al final de hifas en <i>Monilinia</i> spp.	7
Figura 1.5. Detalle al microscopio de la producción de ascosporas por parte de <i>Monilinia fructicola</i>	8
Figura 1.6. Ciclo de vida e infección de <i>Monilinia</i> spp. El área sombreada de gris a la izquierda representa la fase sexual descrita en <i>M. fructicola</i>	9
Figura 1.7. Micrografías de la invasión por <i>Monilinia</i> del tejido de un fruto y la formación de apresorios.....	10
Figura 1.8. Esquema general de la actividad de las CAZymes sobre los componentes principales de la pared celular vegetal.....	13
Figura 1.9. Modelo del reconocimiento específico de membrana y formación de poros por las NLPs	15
Figura 1.10. Detalle al microscopio óptico de infecciones latentes de <i>Monilinia fructicola</i> en nectarinas	18
Figura 1.11. Espectro teórico del cuerpo negro y espectro solar completo en la superficie terrestre y en la parte superior de la atmósfera.....	19
Figura 1.12. Plasticidad fenotípica de <i>Monilinia</i> spp. ante estímulos de luz de longitudes de onda diferentes. Se observan diferencias fenotípicas entre especies y dentro de la misma especie de <i>Monilinia</i> en respuesta a luz blanca, negra (ultravioleta cercano), azul, roja y roja lejana.	23
Figura 1.13. Sistema fotorreceptor y proteínas asociadas descrito en <i>M. laxa</i>	24
Figura 3.1. Representación esquemática de la metodología empleada para cumplir con el objetivo 1 presentado en esta tesis.	38
Figura 3.2. Representación esquemática de la metodología empleada para cumplir con el objetivo 2 presentado en esta tesis.	39
Figura 3.3. Representación esquemática de la metodología empleada para cumplir con el objetivo 3 presentado en esta tesis.	40
Figura 3.4. Representación esquemática de la metodología empleada para cumplir con el objetivo 4 presentado en esta tesis.	41

Figura 4.1. Efecto de la luz blanca sobre dos cepas de <i>M. fructicola</i> tras siete días de incubación.	42
Figura 4.2. Efecto de dos fotoperiodos diferentes de luz blanca sobre la tasa de crecimiento micelial y la esporulación de dos cepas de <i>M. fructicola</i> , 38C y 1C, tras siete días de incubación.	43
Figura 4.3. Arquitectura de los dominios predichos en fotorreceptores y proteínas de la familia velvet en <i>Monilinia fructicola</i> 38C.	45
Figura 4.4. Distribución de términos GO por categoría en los DEG a los 5 minutos y a las 14 horas tras la irradiación con luz blanca de espectro completo.	49
Figura 4.5. Abundancia relativa de especies que codifican para una protenina similar a Far1 en la clase <i>Pezizomycotina</i>	52
Figura 4.6. Análisis evolutivo de los ortólogos de <i>far1</i> mediante el método de Máxima Verosimilitud.	53
Figura 4.7. Cambios en la expresión génica relativa de <i>Mfcvvd1</i> y <i>Mfcfar1</i> tras la exposición a la luz diurna y a la oscuridad continua de <i>M. fructicola</i> 38C cuando crece en tejido de fruta.	54
Figura 4.8. Cambios en la expresión génica relativa de <i>Mfcvvd1</i> , <i>Mfcfar1</i> , <i>Mfccyr1</i> , <i>Mfccry2</i> , <i>Mfcph2</i> y <i>Mfcop2</i> tras la exposición a la luz diurna y a la oscuridad continua de <i>M. fructicola</i> 38C cuando crece sobre PDB.	55
Figura 4.9. Crecimiento colonial de <i>M. fructicola</i> 38C tras siete días de cultivo ...	56
Figura 4.10. Efecto de dos fotoperiodos diferentes de luz roja y azul sobre la tasa de crecimiento del micelio y la esporulación de <i>M. fructicola</i> 38C tras siete días de incubación. ...	57
Figura 4.11. Test de medida de la incidencia de la enfermedad en diferentes condiciones de iluminación.	58
Figura 4.12. Cambios en la expresión génica relativa de dos genes relacionados con la fotorrecepción.	59
Figura 4.13. Cambios en la expresión génica relativa de los genes codificantes para la CAZyme <i>Mfcpme3</i>	60
Figura 4.14. Cambios en la expresión génica relativa de los genes codificantes para la CAZyme <i>Mfcpg1</i>	61
Figura 4.15. Cambios en la expresión génica relativa de los genes codificantes para la CAZyme <i>Mfcpn1</i>	62
Figura 4.16. Cambios en la expresión génica relativa del gen <i>Mfcnep2</i>	63
Figura 4.17. Nectarinas inoculadas con discos de PDA con micelio <i>M. fructigena</i> Mgena6	64
Figura 4.18. Análisis de Componentes Principales (PCA) de los datos de expresión génica global normalizada de <i>M. fructigena</i> Mgena6.	65

Figura 4.19. Diagramas de Venn de los genes de <i>M. fructigena</i> Mgena6 expresados diferencialmente (DEG)	66
Figura 4.20. Número de DEGs enriquecidos con términos GO por categorías	67
Figura 4.21. Diagramas de Venn de los genes de <i>M. fructigena</i> Mgena6 expresados diferencialmente (DEG)	68
Figura 4.22. Número de DEGs enriquecidos con términos GO por categorías	69
Figura 4.23. Valores de expresión relativa de los transcritos que se expresan de forma significativamente diferente en los intervalos de 5 min y 14 h.	71
Figura 4.24. Valores de expresión relativa de los transcritos que se expresan de forma significativamente diferente en los intervalos de 5 min y 14 h.	72
Figura 4.25. Patrones de expresión observados para dos genes codificantes de CAZymes y la toxina formadora de poros <i>Nep2</i>	73
Figure 4.26. Efecto de varias longitudes de onda y fotoperiodos en el crecimiento de tres especies de <i>Monilinia</i>	75
Figura 4.27. Incidencia de la podredumbre parda en nectarinas causada por tres especies diferentes de <i>Monilinia</i> spp.....	76
Figura 4.28. Arquitectura de los dominios predichos en fotorreceptores y proteínas de la familia velvet en <i>Monilinia fructigena</i> Mgena6.	77
Figura 4.29. Cambios en la expresión génica relativa de los genes <i>pme3</i> <i>pme2</i> y <i>cut1</i> en <i>M. fructicola</i> 38C, <i>M. laxa</i> 8L y <i>M. fructigena</i> Mgena6	80
Figura 4.30. Cambios en la expresión génica relativa cuatro genes codificantes para CAZymes en <i>M. fructicola</i> 38C, <i>M. laxa</i> 8L y <i>M. fructigena</i> Mgena6	81
Figura 4.31. Caracterización de NLPs en <i>Monilinia</i> spp	83
Figura 4.32. Estructura 3D de las proteínas NEP1 y NEP2	85
Figura 4.33. Predicción estructural de los efectos de la presencia de una alanina o cisteína en la posición 190 de NEP2.....	85
Figura 4.34. Conformación homotrimérica de NEP2	86
Figura 4.35. Estructura del oligómero maduro NEP2 de <i>Monilinia fructicola</i>	87
Figura 4.36. Cambios en la expresión génica relativa de los genes <i>nep1</i> y <i>nep2</i> en <i>M. fructicola</i> 38C, <i>M. laxa</i> 8L y <i>M. fructigena</i> Mgena6	88
Figura 4.37. Alineación por pares de las regiones promotoras y ORFs de <i>nep1</i>	90
Figura 4.38. Alineamiento por pares de las regiones promotoras y ORFs de <i>nep2</i>	91
Figura 4.39. Posibles dianas de unión de factores transcripcionales en las regiones promotoras de <i>nep1</i> y <i>nep2</i> de los aislados <i>M. fructicola</i> 38C, <i>M. laxa</i> 8L y <i>M. fructigena</i> Mgena6.	92

Lista de Tablas

Tabla 3.1. Características de los tubos fluorescentes usados en esta tesis.	29
Tabla 3.2. Cebadores usados en esta tesis.	33
Tabla 4.1. Proteínas relacionadas con la fotorrecepción en <i>M. fructicola</i> 38C y homología de sus dominios conservados en <i>B. cinerea</i> y <i>M. laxa</i>	46
Tabla 4.4. Valores de expresión medidos en TPMs para los genes posiblemente relacionados con la fotorrecepción en <i>M. fructicola</i> 38C.	50
Tabla 4.5. Número de CAZymes expresadas diferencialmente en cada comparación distribuidas por subconjuntos de la familia CAZyme.	70
Tabla 4.6. Resultados de las búsquedas en el metiservidor dbCAN3.	78
Tabla S4.1. Genes expresados diferencialmente compartidos entre las muestras de 5 minutos y 14 horas de iluminación.	138
Tabla S4.2. Valores de expresión génica diferencial obtenidos por RNAseq en <i>M. fructigena</i> Mgena6 de un grupo de CWDEs importante para el desarrollo de la patogénesis en <i>Monilinia</i> spp.	139
Tabla S4.3. Valores de expresión génica diferencial obtenidos por RNAseq en <i>M. fructigena</i> Mgena6 de los genes potencialmente implicados en la respuesta a luz.	140

Abreviaturas y Acrónimos

AA	Actividad Auxiliar
ADNc	Acido DexosirriboNucleico complementario
ANOVA	Análisis de varianza
ARN	Ácido ribonucleico
ARNT	Proteína translocadora del receptor nuclear, del inglés <i>Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator protein</i>
Ca ²⁺	Catión Calcio
CAZyme	Enzima activa en carbohidratos, del inglés <i>Carbohydrate Active enZyme</i>
CBM	Módulo de unión a carbohidratos, del inglés <i>Carbohydrate Binding Module</i>
CE	Carbohidrato esterasa
CETM	Colección Española de Cultivos Tipo
CTAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
CWDE	Enzima degradadora de la pared celular, del inglés <i>Cell-Wall Degrading Enzyme</i>
DEG	Gen expresado diferencialmente, del inglés <i>Differentially Expressed Gene</i>
EPPO	Organización europea y mediterránea para la protección vegetal
ETP	Toxina epipolitiiodoxopiperazina
FAD	Flavín adenín dinucleótido
FC	“ <i>Fold Change</i> ”, variación encontrada en los niveles de expresión génica
FMN	Flavín mononucleótido
GH	Glucósido hidrolasa
GIPC	Glicosilinositol fosforilceramidas
HPLC	Cromatografía de líquidos de alto rendimiento, del inglés <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HR	Humedad relativa
LED	Diodo emisor de luz, del inglés <i>Light Emiting Diode</i>
LIG	Gen inducido por luz, del inglés <i>Light Induced Gene</i>
LOV	Luz, Voltaje, Oxígeno, del inglés <i>Light, Voltage, Oxygen</i>
LRE	Elemento regulador de luz, del inglés <i>Light Regulatory Element</i>
LRG	Gen reprimido por luz, del inglés <i>Light Repressed Gene</i>
MAPA	Ministerio de agricultura, pesca y alimentación
Mg ²⁺	Cation Magnesio

MTHF	Metiltetrahidrofolato
NEP1-like	Proteínas similares a NEP1, del inglés “ <i>Necrosis- and Ethylene producing Protein</i> ”
nLC-MS/MS	Espectrometría de masas por nanocromatografía líquida
NLP	Proteínas inductoras de necrosis y etileno
NRPS	Péptido sintasa no ribosomal, del inglés <i>Non-Ribosomal Peptide Synthase</i>
ORF	Marco abierto de lectura, del inglés <i>Open Reading Frame</i>
PAE	Error de alineación predicho, del inglés <i>Predicted Alignment Error</i>
PAS	Per, ARNT, SIM
pb	Pares de bases
PCA	Análisis de componentes principales del inglés <i>Principal Component Analysis</i>
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa, del inglés <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDA	Agar patata dextrosa, del inglés <i>Potato Dextrose Agar</i>
PDB	Caldo patata dextrosa, del inglés <i>Potato Dextrose Broth</i>
Per	Proteína del periodo circadiano
PHR	Región homologa a fotoliasa, del inglés <i>Photolyase Homologue Region</i>
PL	Polisacárido liasa
pLDDT	Prueba de diferencia de distancia local predicha
RNAseq	Secuenciación de ARN
rpm	Revoluciones por minuto
RT-qPCR	PCR cuantitativa tras transcripción inversa
SIM	Proteína “ <i>single-minded</i> ”
SP	Péptido señal, del inglés <i>Signal Peptide</i>
TF	Factor de transcripción, del inglés <i>Transcription Factor</i>
TFM	Trabajo final de máster
TPM	Transcritos por millón de kilobases, del inglés <i>Transcripts Per Million</i>
UV	Ultravioleta
WCC	Complejo <i>White Collar</i> , del inglés <i>White Collar Complex</i>

1. Introducción

1.1. Podredumbre parda causada por *Monilinia* spp. en *Prunus persica*

La podredumbre parda, causada por hongos del género *Monilinia* spp., es una enfermedad vegetal que principalmente afecta al cultivo de árboles frutales del género *Prunus*, dentro de la familia Rosaceae, conocidos comúnmente como fruta de hueso (Byrde y Willetts, 1977). Dentro de este cultivo aparecen especies como el melocotón o nectarina (*P. persica* o *P. persica* var. *nucipersica*), el albaricoque (*P. armeniaca*), la cereza o guinda (*P. avium* o *P. cerasus*), la ciruela (*P. domestica*) o la almendra (*P. dulcis* var. *dulcis*), además de una gran cantidad de híbridos y variedades comerciales. Todos son drupas, frutos carnosos con una única semilla rodeada por un pericarpio, salvo la almendra, que se trata de un fruto seco con una sola semilla. La podredumbre parda en menor medida también puede causar daños en el cultivo de fruta de pepita como manzana, pera o membrillo (Grabke et al., 2011; Poniatowska et al., 2013).

1.2. *Prunus persica*

El melocotón y la nectarina son las especies de fruta de hueso con mayor contribución a la producción final agraria de fruta dulce en España (29%), con una producción anual de 1.354.417 Tm, de las que más del 20% se exportan (MAPA, 2023). El melocotonero y la nectarina ocupan en España una superficie de 49.868 ha y 30.442 ha, respectivamente. Se distribuye por todo el territorio nacional, aunque la producción se centra principalmente en Cataluña (450.913 Tm), Aragón (439.429 Tm), Murcia (341.467 Tm), Extremadura (256.950 Tm) y Andalucía (81.264 Tm) (MAPA, 2023). La mayor producción se localiza en el Valle del Ebro donde se producen 890.342 Tm, especialmente en las provincias de Lleida, Huesca y Zaragoza.

El fruto del melocotón/nectarina se desarrolla desde un solo ovario que madura tanto en un exterior carnoso comestible como en la semilla interior, dura y no comestible. El pericarpio está diferenciado en tres capas: el endocarpio, que está

fuertemente lignificado y rodea la semilla; el mesocarpio, que es la parte carnosa y comestible del fruto; y el exocarpio o piel (figura 1.1) (Dardick & Callahan, 2014; Rodriguez et al., 2019).

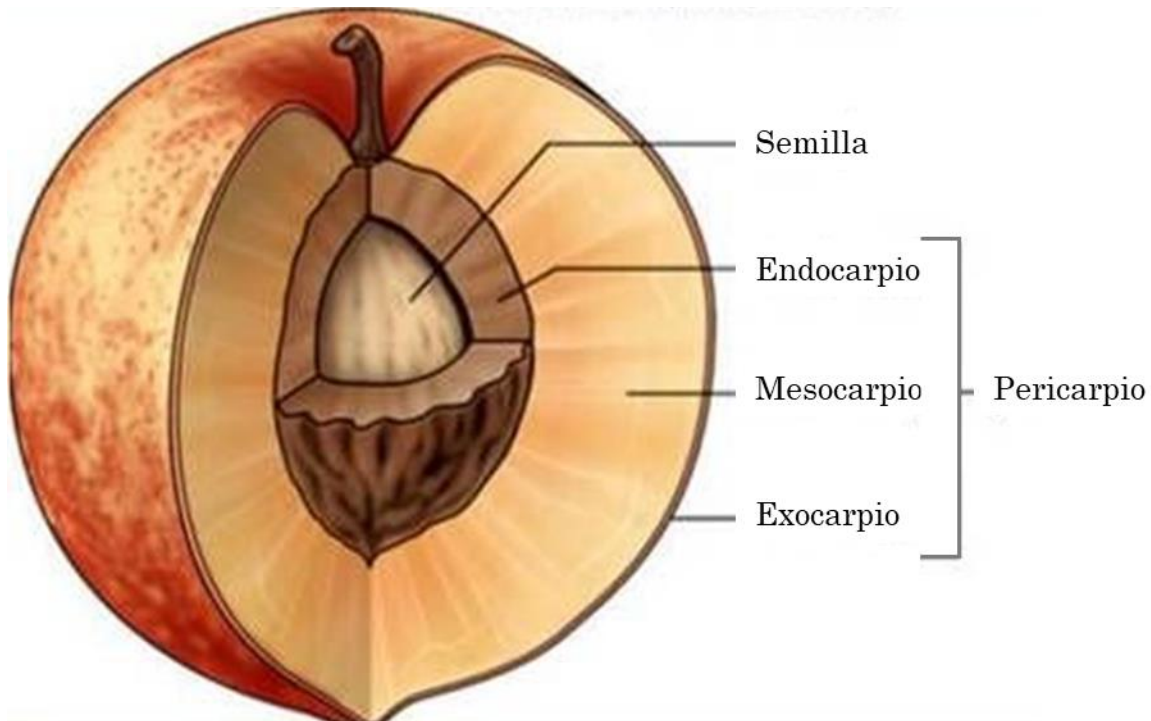


Figura 1.1. Estructura básica de un fruto de melocotón, tipo drupa (Modificado de <https://biology4isc.weebly.com/seeds-and-fruits.html>).

El mesocarpio está formado por las células de parénquima que tienen un protoplasto activo, donde se producen todas las reacciones metabólicas, y una pared celular con gran contenido en pectina, aunque la composición y estructura exactas de la pared celular del fruto dependen del estado madurativo de éste (Muramatsu et al., 2004).

El exocarpio está estructurado en una o dos capas de células hipodérmicas seguido por tres a cuatro capas desorganizadas y multiseriadas de células epidérmicas, y éstas, cubiertas por una cutícula (Fernández et al., 2011). La cutícula está compuesta por un poliéster insoluble llamado cutina, y ceras, que pueden ser tanto integrales en la cutícula (intracuticular) como depositadas (epicuticular) sobre la superficie de la misma (Fernández et al., 2011). La cutícula cumple funciones como

la impermeabilización y la protección frente a microorganismos patógenos y ataques de insectos (Lanza & Di Serio, 2015). Además de la barrera física que presenta la cutícula, el exocarpo juega un papel importante en la defensa del fruto estableciendo barreras químicas, entre las que se incluyen la biosíntesis de flavonoides, el estrés oxidativo y la activación de defensas por reconocimiento de patrones moleculares o efectores (Cerri & Reale, 2020).

1.3. Podredumbre parda

La podredumbre parda causada por *Monilinia* spp. es una de las principales enfermedades del melocotón y nectarina en España, estando presente en todas las zonas de cultivo (De Cal & Melgarejo, 2000). El género *Monilinia* spp. infecta las células vegetales de diversas partes del melocotonero para obtener nutrientes, generando así una gran variedad de síntomas como la marchitez en flores, brotes y yemas, chancros en las ramas y, sobre todo, podredumbre en los frutos (figura 1.2) (De Cal & Melgarejo, 2000). Los frutos pueden ser atacados en cualquier fase de su desarrollo, siendo más vulnerables a medida que se acercan a la madurez (García-Benitez et al., 2017b; Xu et al., 2007). En condiciones propicias, los síntomas iniciales de podredumbre aparecen entre 48 y 72 horas después de la infección (Byrde & Willetts, 1977). Las primeras señales en el fruto son pequeñas manchas marrones y, en ocasiones, decoloración de la cutícula, que rápidamente progresan hacia la podredumbre.



Figura 1.2. Podredumbre en frutos de melocotón en el suelo (A) y en frutos momificados en el árbol (B), causada por *Monilinia* spp. Fotografías facilitadas por (A) el Departamento de Postcosecha del IRTA-Lleida y (B) el Grupo de Hongos Fitopatógenos del Departamento de Protección Vegetal CSIC-INIA.

El micelio de *Monilinia* spp. se desarrolla rápidamente dentro y en la superficie del fruto, degradando la cutícula y la epidermis a las 24 h de la infección, produciendo el colapso gradual de las células epidérmicas después de 48 h y posteriormente expandiéndose a través de la subepidermis trascurridas 72 h desde la infección (figura 1.3) (García-Benitez et al., 2016). El micelio del hongo terminará por cubrir toda la superficie del fruto y producir nuevas conidias, que pueden provocar nuevas infecciones al ser dispersadas por acción tanto del aire, como del agua de lluvia, o ser trasladadas por insectos a otros frutos o bien por contacto directo entre frutos cercanos (Bannon et al., 2009; Michailides & Morgan, 1997). Tras la cosecha, los frutos con síntomas de podredumbre no suelen desprenderse del pedúnculo, por lo que permanecen en el árbol, donde se deshidratan y se convierten en las denominadas momias, las cuales son características de la enfermedad.

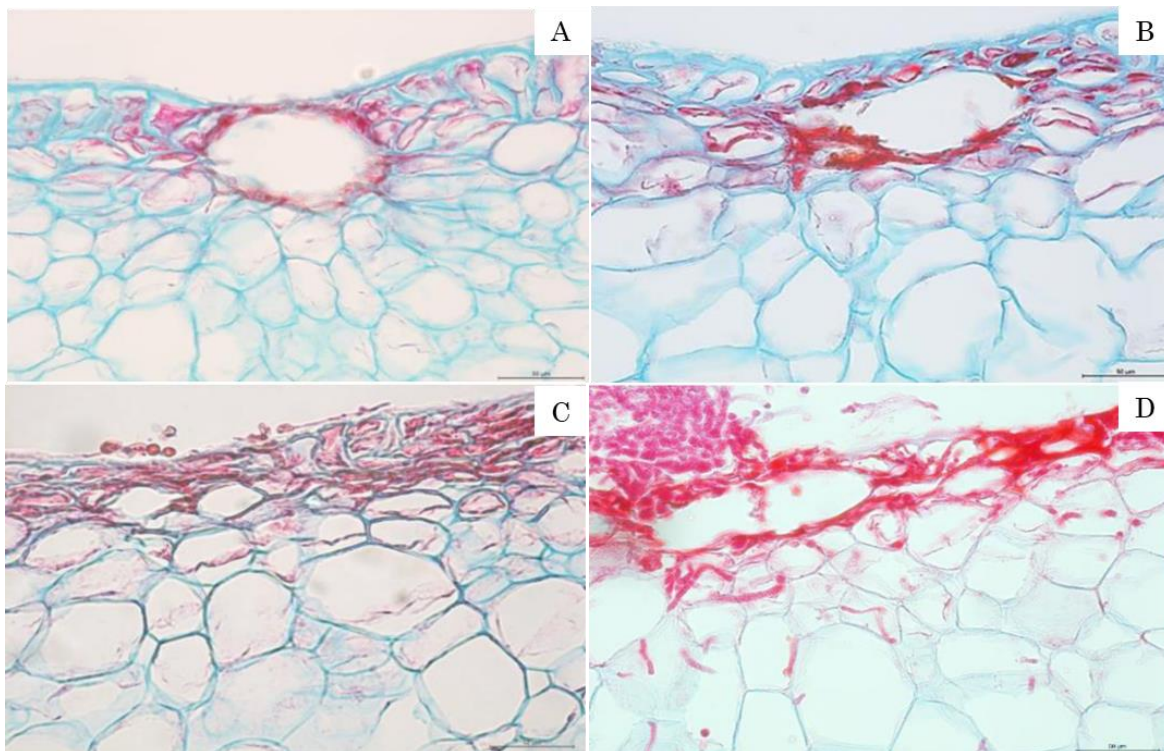


Figura 1.3. Detalle al microscopio óptico del proceso de infección por *Monilinia* de una nectarina. (A) a las 24 horas de la inoculación, el micelio se encuentra próximo al estoma del fruto, (B) a las 48 horas el micelio coloniza el estoma, (C) a las 72 horas el micelio se extiende por la epidermis y parte del mesocarpio y (D) a las 96 horas el micelio coloniza totalmente el mesocarpio del fruto. Adaptado de García-Benitez et al. (2016). Células del hongo teñidas de rojo con *Safranin O-fast Green Stain*.

La podredumbre parda del melocotón ocurre de forma rutinaria en precosecha y en todas las etapas del proceso de manejo postcosecha, afectando predominantemente

a variedades tardías que, bajo condiciones meteorológicas favorables al desarrollo de la enfermedad, acumulan pérdidas por podredumbre de hasta el 80% de la producción (Larena et al., 2005; Usall et al., 2015). Estas pérdidas pueden llegar a suponer, en precio medio percibido por el agricultor, una cantidad anual de 776,88 millones de euros sólo en el cultivo de melocotones y nectarinas (MAPA, 2023). Además, es posible que se produzcan pérdidas adicionales en postcosecha debido a infecciones latentes, infecciones que se producen en el campo y no manifiestan síntomas hasta que las condiciones climáticas o de madurez del fruto sean favorables al desarrollo de la enfermedad. La incidencia de dichas infecciones latentes suele oscilar entre el 0% y el 30% de la podredumbre, aunque puede llegar incluso al 50% en postcosecha (García-Benitez et al., 2017a). En la mayoría de los casos, las infecciones latentes no desarrollan síntomas visibles hasta que el fruto llega al supermercado o a los consumidores, lo que conlleva pérdidas económicas adicionales debido a la pérdida de confianza de los mismos.

1.4. Agentes causales de la podredumbre parda

1.4.1. Identificación y distribución

El género *Monilinia* spp. está incluido dentro de la familia *Sclerotiniaceae*, en la clase *Leotiomycetes*, subfilum *Pezizomycotina*, dentro del filum *Ascomycota* (Byrde & Willetts, 1977). Hay descritas seis especies capaces de producir podredumbre parda en fruta de hueso a nivel mundial. Estas son *M. fructicola*, *M. laxa*, *M. fructigena*, *M. polystroma*, *M. numecola* y *M. yunnanesis* (Wang et al., 2018), aunque las principales causantes de la enfermedad en huertos españoles son *M. laxa*, *M. fructigena* y, desde su introducción en 2006, *M. fructicola* (De Cal et al., 2009).

Aunque existen diferencias morfológicas entre las principales especies causantes de podredumbre parda en fruta de hueso en España, es difícil su diferenciación observando sólo los síntomas de la enfermedad. Para la identificación de las especies de *Monilinia* ha recurrido tradicionalmente a técnicas conjuntas basadas en la tasa de crecimiento diferencial bajo luz ultravioleta y la distancia en la ramificación del tubo germinativo de la conidia (De Cal & Melgarejo, 1999). También analizando la morfología y el color del micelio en cultivo de agar patata dextrosa (Potato Dextrose Agar, PDA), además de la presencia de esclerocios sobre la colonia (Villarino et al., 2016). *M. fructicola* presenta mayor producción de

esclerocios y una tasa de crecimiento y esporulación más elevada que *M. laxa* y *M. fructigena* (Villarino et al., 2016). Por otra parte, *M. laxa* presenta lóbulos en los márgenes de crecimiento en las colonias y menor longitud de tubos germinativos y entre las ramificaciones de estos (De Cal & Melgarejo, 1999).

La identificación de *Monilinia* spp. usando una combinación de características morfológicas es posible, pero debido a que la mayoría son cuantitativas y existe cierto solapamiento entre especies, los métodos clásicos son insuficientes para un diagnóstico rápido y correcto de muchas cepas (PM 7/18 (3) *Monilinia fructicola*, 2020). Por lo tanto, es recomendable recurrir a técnicas moleculares basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain Reaction*, PCR) para su identificación rápida y segura (Gell et al., 2007). La Organización Europea y Mediterránea para la Protección Vegetal (EPPO) ofrece un diagrama de flujo para la identificación de *Monilinia* spp., que combina técnicas tradicionales con resultados positivos de PCR convencional o qPCR (PM 7/18 (3) *Monilinia fructicola*, 2020). También se han desarrollado técnicas basadas en qPCR que permiten la detección e identificación de las especies de *Monilinia* en infecciones latentes (García-Benitez et al., 2017a). Actualmente se cuenta con secuencias genómicas para las principales especies de *Monilinia* causantes de podredumbre parda en España, por lo que la clasificación puede realizarse a nivel génico (De Miccolis Angelini et al., 2018; Naranjo-Ortíz et al., 2018; Vilanova et al., 2021).

El género *Monilinia* tiene una distribución cosmopolita, aunque no todas las especies están presentes en todas las zonas de los frutales de hueso. A principios de siglo, *M. laxa* estaba presente en Estados Unidos y fue la primera especie identificada como causante de la enfermedad en Europa (Byrde & Willetts, 1977; De Miccolis Angelini et al., 2022). *M. fructigena* también está distribuida por Europa, Asia, el norte de África y algunas regiones de Sudamérica, pero es un patógeno de cuarentena en Canadá, Estados Unidos, Australia y Nueva Zelanda (De Miccolis Angelini et al., 2022). *M. fructicola* fue identificada por primera vez en el continente americano, Australia y Nueva Zelanda (EPPO & CABI, 1997). En 2001 se reportó por primera vez la aparición de *M. fructicola* en Europa en Francia (Lichou et al., 2002), posteriormente se detectó en República Checa (Duchoslavová et al., 2007), en España en 2006 (De Cal et al., 2009), Italia (Pellegrino et al., 2009), Eslovenia (Munda & Marn, 2010), Alemania (Grabke et al., 2011), Serbia (Hrustić et al., 2013), Turquía (Uysal et al., 2019), Hungría (Petróczy & Palkovics, 2006), Suiza (Bosshard et al., 2006), República de Eslovaquia (Ondejkova et al., 2010), Bulgaria (Bobev et al., 2020), y Montenegro (Latinović et al., 2017). Desde 2016,

M. fructicola ha aumentado su frecuencia en los huertos comerciales españoles, llegando al mismo nivel que *M. laxa*, y desplazando a *M. fructigena*, que no se ha vuelto a aislar sobre melocotones en el Valle del Ebro (Villarino et al., 2016).

1.4.2. Morfología y ciclo de vida del patógeno

En medio de cultivo, *Monilinia* spp. presenta un micelio hialino, que con el paso del tiempo acumula melanina en una capa estromática irregular y oscura (De Cal & Melgarejo, 1994). Las esporas asexuales, o macroconidias son la principal fuente de inóculo, presentan forma de limón (figura 1.4) y unas dimensiones entre 6-11 μm de ancho y 15-21 μm de largo que pueden variar debido a las condiciones ambientales (Tian & Bertolini, 1999). Además, *Monilinia* spp. también puede producir microconidias, con un diámetro de 2 μm . Las microconidias se forman en conidióforos con forma de botella llamados fiáldas, agrupados en pseudopicnidios (Byrde & Willetts, 1977). Estas microconidias no germinan, poseen mitocondrias y un único núcleo (Zubieta 2022. TFM), y son metabólicamente activas (Lee et al., 2010), pudiendo tener una función espermatida en la formación de apotecios (Byrde & Willetts, 1977).

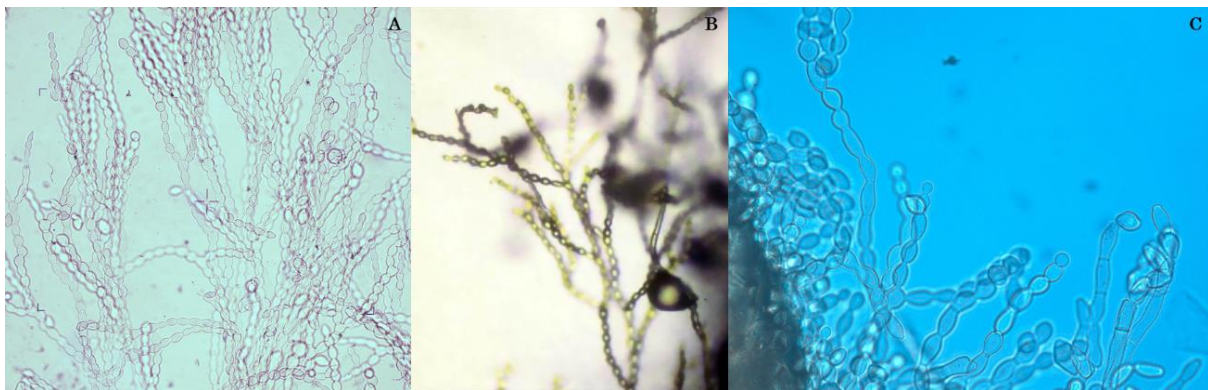


Figura 1.4. Detalle al microscopio óptico del micelio y conidias de *Monilinia* spp. (A) y (B) Cadena de conidias de *Monilinia* spp. (C) Formación de conidias al final de hifas en *Monilinia* spp.

Monilinia spp. presenta dos estados de crecimiento, un estado anamorfo, asexual o imperfecto, denominado *Monilia*, en el que se producen esporas asexuales o conidias (figura 1.4), y un estado teleomorfo, sexual o perfecto, caracterizado por la producción de esporas sexuales o ascosporas, que se forman en el interior de las ascas dentro de un cuerpo fructífero denominado apotecio (figura 1.5) (Byrde & Willetts, 1977). La reproducción sexual de *Monilinia* spp. se ha observado sólo en

M. fructicola, en donde se ha descrito tanto en campo, sobre fruta momificada en el suelo, como en condiciones controladas de laboratorio (Byrde & Willetts, 1977; De Cal et al., 2014). Sin embargo, dicha reproducción sexual en *M. fructicola* no se ha registrado en ningún huerto de melocotón de España hasta la fecha (Villarino et al., 2010), pero si en condiciones controladas (De Cal et al., 2014). *Monilinia* spp. es un hongo heterotálico, y necesita para su reproducción sexual de dos individuos compatibles portando ideomorfos opuestos para los genes *MAT1*, que gobiernan el sistema de apareamiento en *Ascomycetos* (Abate, De Miccolis Angelini, et al., 2018).

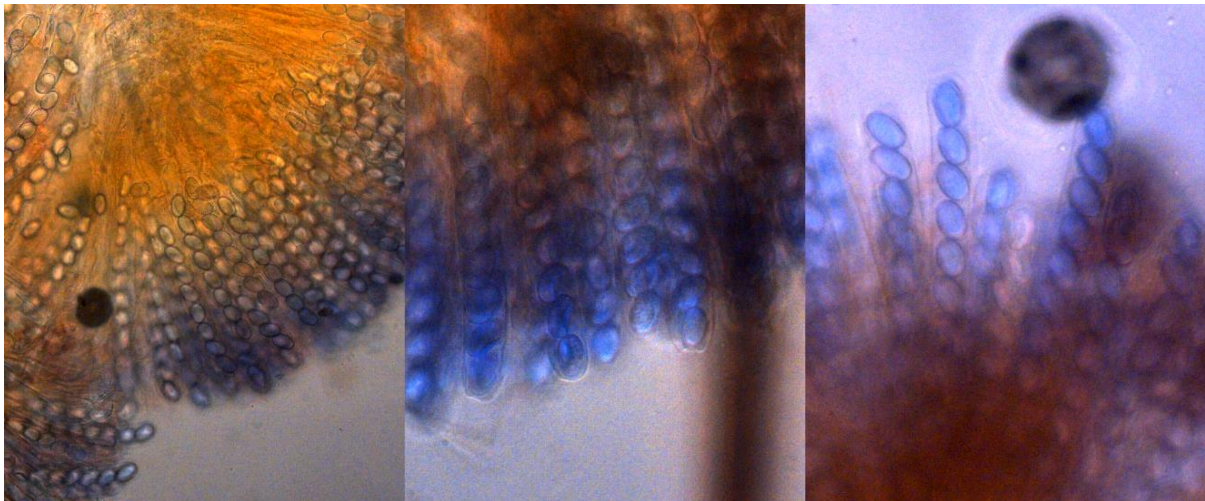


Figura 1.5. Detalle al microscopio de la producción de ascosporas por parte de *Monilinia fructicola* sobre momias de nectarinas en condiciones controladas (De Cal et al 2014).

El ciclo de vida de *Monilinia* spp. consta de un inóculo primario que aparece tras el periodo invernal, y un inóculo secundario (figura 1.6) tras cualquiera de los ciclos vitales del patógeno que se producen a lo largo de la estación de cultivo (Byrde & Willetts, 1977). En los huertos de melocotoneros del Valle del Ebro, *Monilinia* sobrevive al invierno en forma de micelio en frutos momificados que quedan de la campaña anterior, tanto en los árboles como en el suelo (Villarino et al., 2010) (figura 1.6). Se ha encontrado una correlación positiva entre el número de frutas momificadas sobre los árboles desde el año anterior y la incidencia de podredumbre parda en postcosecha o de infecciones latentes en huertos de melocotoneros (Villarino et al., 2010). *Monilinia* también sobrevive infectando tejidos de yemas y ramas (Byrde & Willetts, 1977). Al comienzo de la primavera, el micelio del inóculo primario desarrolla hifas modificadas llamadas esporodoquios, encargadas de producir conidias. En la mayoría de los casos, tanto el inóculo primario como el

secundario está formado por conidias asexuales, y/o micelio, aunque en el caso de *M. fructicola* el inoculo primario pueden estar formado además por ascosporas formadas tras un proceso de reproducción sexual (Byrde & Willetts, 1977).

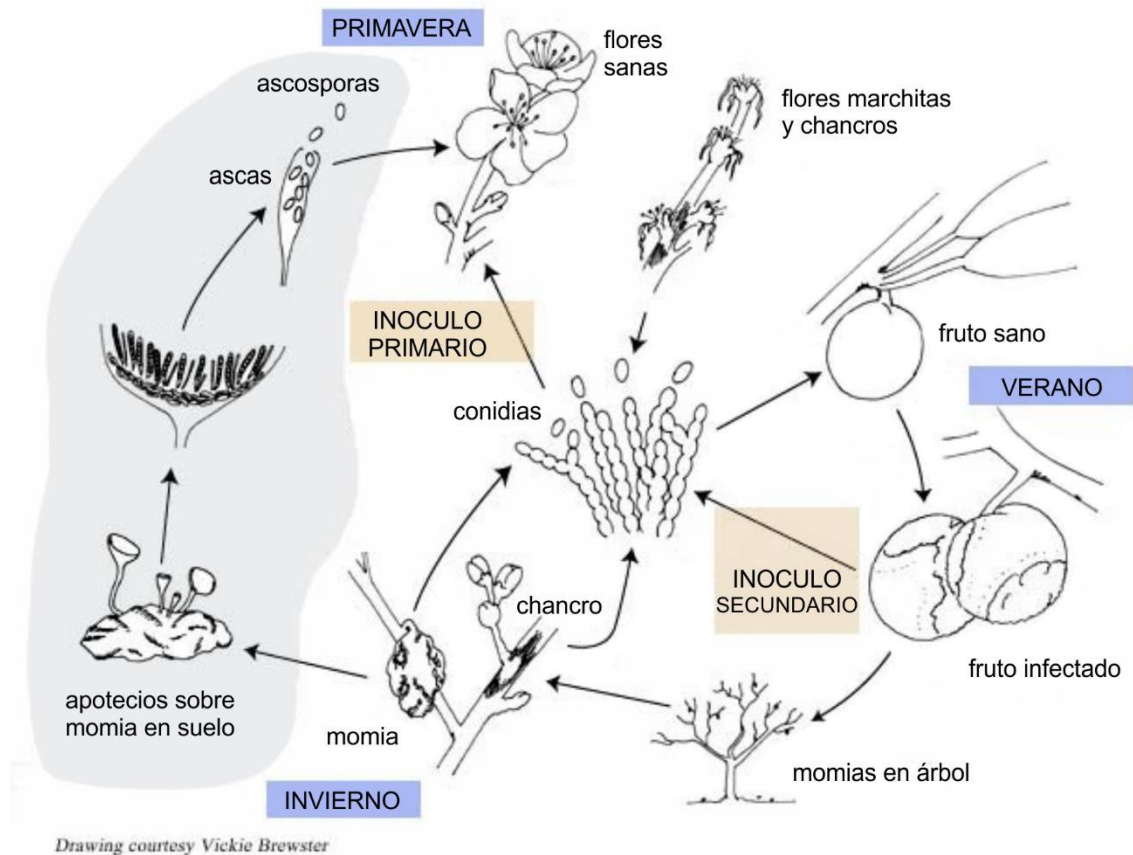


Figura 1.6. Ciclo de vida e infección de *Monilinia* spp. El área sombreada de gris a la izquierda representa la fase sexual descrita en *M. fructicola*. (Imagen adaptada de (Dowling et al., 2019).

1.4.3. Proceso de infección del agente patógeno

La podredumbre parda es una enfermedad policíclica, en la cual el ciclo vital del patógeno está basado en: infección, esporulación y diseminación, repitiéndose varias veces a lo largo de la temporada de cultivo (Byrde & Willetts, 1977). El proceso de infección por parte de *Monilinia* spp. comienza cuando las fuentes de inóculo primario o secundario entra en contacto con un órgano del huésped susceptible, y se puede dividir en las siguientes fases: adhesión, penetración y colonización.

Las conidias de *Monilinia* spp. llegan a la superficie de flores, brotes y frutos del melocotonero pasivamente, llevadas por el viento, el agua de lluvia, insectos, o por contacto directo con otros órganos infectados (Oliveira Lino et al., 2016). Si las condiciones ambientales son adecuadas, comienza la fase de adhesión. Las conidias germinan, produciendo tubos germinativos o apresorios dependiendo de las condiciones ambientales y del estado de maduración del fruto (figura 1.7) (García-Benitez et al., 2017b).

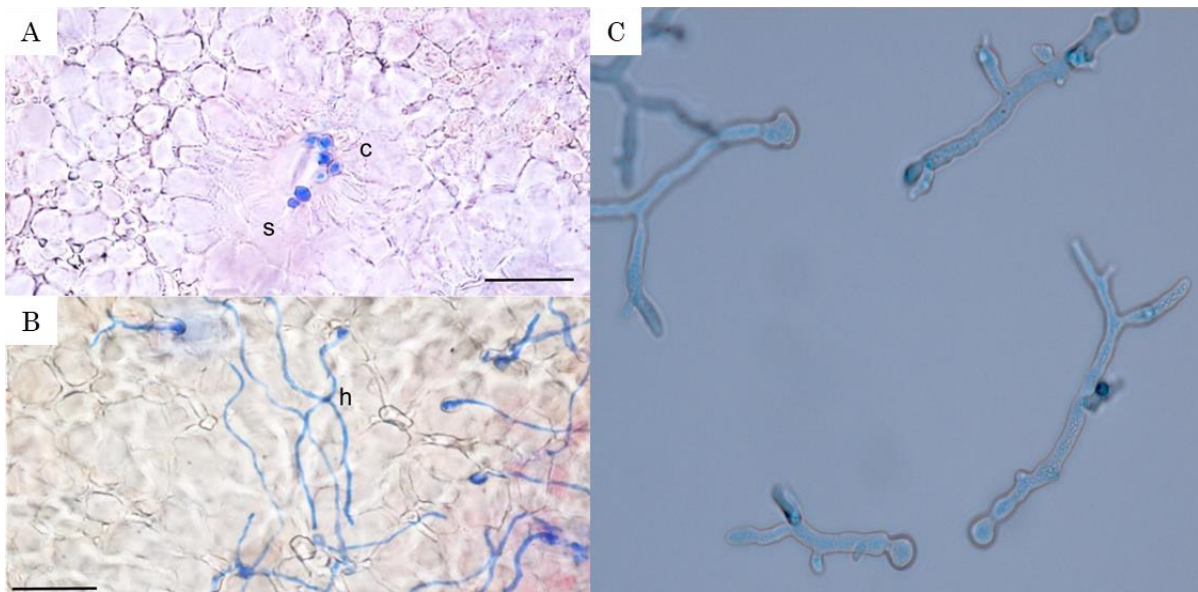


Figura 1.7. Micrografías de la invasión por *Monilinia* del tejido de un fruto y la formación de apresorios. (A) Conidias sin germinar (c) agrupadas alrededor de un estoma (s). (B) Tubos germinativos (h) sobre la superficie de nectarina tras 24 horas de incubación a 25 °C. (C) Detalle de apresorios y tubos germinativos por parte de *Monilinia* spp. al microscopio óptico. Micelio teñido con azul de lactofenol. Adaptado de García-Benitez et al. (2016).

Tras la germinación del inóculo, el tubo germinativo y/o apresorio recién formado debe penetrar la cutícula del fruto, formada por un poliéster insoluble de cutina y ceras (Fernández et al., 2011). *Monilinia* spp. tiene dos vías para lograrlo, penetrar directamente mediante la producción de cutinasas (Bostock et al., 1999; Lee et al., 2010), o de forma indirecta, a través de aberturas naturales en la cutícula como pueden ser los estomas o tricomas, o por heridas causadas por insectos o prácticas agrícolas durante la cosecha (García-Benitez et al., 2016; Oliveira Lino et al., 2016).

Una vez superada la cutícula, el micelio crece y se ramifica extendiéndose por los tejidos del exocarpo y el mesocarpo del fruto, destruyendo las células y obteniendo

de ellas los nutrientes necesarios para el desarrollo fúngico (Byrde & Willetts, 1977). En el caso de *M. fructicola*, cuando se analiza el proceso infectivo, se ha determinado que los signos de la enfermedad comienzan a ser aparentes cuando las células epidérmicas bajo la cutícula comienzan a colapsar 48 horas tras la infección, incrementando a las 72 horas. Esto viene acompañado de una extensa colonización de los tejidos subdérmicos profundos del mesocarpio por *M. fructicola* y la aparición de cavidades lisogénicas. El mesocarpio está compuesto por células de parénquima que tienen un protoplasto activo, donde se producen todas las reacciones metabólicas, y una pared celular con gran contenido en pectina. Tras 96 horas de infección, estos síntomas vienen acompañados no sólo por la degradación de la cutícula, la epidermis y, el mesocarpio sino también por esporulación del hongo en la superficie del fruto infectado (García-Benitez et al., 2016), que actuarán como fuente de inóculo secundario, pudiendo causar nuevas infecciones (Landgraf & Zehr, 1982; Villarino et al., 2012).

1.5. Factores de virulencia

Un factor de virulencia es una molécula, estructura celular o sistema regulatorio que permite a un patógeno colonizar al huésped; evadir su respuesta inmune o suprimir dicha respuesta; entrar, salir y moverse entre las células del huésped; y obtener nutrientes del mismo (Casadevall & Pirofski, 2009). *Monilinia* spp., como hongo necrótrofo, utiliza varios factores de virulencia para penetrar y colonizar el melocotón mediante la acción individual o combinada de enzimas degradativas y sustancias tóxicas (toxinas) que matan las células que a continuación coloniza. Enzimas extracelulares con actividad hidrolítica como las cutinasas y aquellas implicadas en la degradación de la pared celular vegetal, o las proteasas implicadas en la degradación de proteínas presentes en la membranas celulares han sido descritas en *Monilinia* spp como potenciales agentes de virulencia (García-Benitez et al., 2019). El ataque inicial de *M. fructicola* se inicia con la secreción localizada en la punta de la hifa de una actividad pectinasa (Wade & Cruickshank, 1992; Hall, 1971) que provoca la ruptura de la laminilla media dando lugar a la maceración del tejido y en muchos casos a la muerte de las células del huésped afectadas (Paynter & Jen, 1975). Las tres especies de *Monilinia* producen xilanasas, poligalacturonasas, pectin-esterasas, β -glucosidasas y proteasas, mientras que sólo los aislados de *M. fructicola* producían cutinasas en medio de cultivo (García-Benitez et al., 2019). Adicionalmente se observó que pectin-esterasas y poligalacturonasas sintéticas producían una lesión en el fruto, mientras que

xilanasas purificadas no producían ninguna lesión visible (García-Benitez et al., 2019).

1.5.1. CAZymes

Las CAZymes son enzimas cuya función es atacar los enlaces glucosídicos presentes en los polisacáridos de la pared celular vegetal, y están consideradas como uno de los principales factores de virulencia en hongos fitopatógenos, ya que ayudan a los mismos a invadir los tejidos del huésped (Cantu et al., 2008). Estas enzimas pueden tener dos componentes, un módulo catalítico, subdividido en varias clases y familias de enzimas que catalizan la descomposición, biosíntesis y/o modificación de glicoconjugados, oligo- y polisacáridos; y un módulo asociado, no catalítico, que acompaña a los módulos catalíticos (<http://www.cazy.org/>; Drula et al., 2022). Atendiendo a la actividad catalítica, las CAZymes se puede organizar en diferentes familias: i) glucósido hidrolasas (GHs) encargadas de la hidrólisis y/o reorganización de los enlaces glicosídicos, ii) glicosiltransferasas (GTs) cuya función es la formación de enlaces glicosídicos, iii) polisacárido liasas (PLs) que dividen de forma no hidrolítica los enlaces glicosídicos, iv) carbohidrato esterasas (CEs) encargadas de la hidrólisis de ésteres de hidratos de carbono, y actividades auxiliares (AAs), que son enzimas redox que actúan conjuntamente con las CAZymes. Además, dentro de los módulos asociados no catalíticos, actualmente sólo se encuentra la categoría de módulos de unión a carbohidratos (CBMs), cuyo papel es asistir en la adhesión a carbohidratos (<http://www.cazy.org/>; Drula et al., 2022). Además, se puede diferenciar subfamilias de CAZymes, que son subgrupos que se encuentran dentro de una familia que comparten un antepasado reciente y, que suelen ser uniformes en su función molecular (figura 1.8) (<http://www.cazy.org/>; Drula et al., 2022).

Monilinia spp. secreta enzimas con capacidad de degradar pectinas como poligalacturonasas (Chou et al., 2015), pectinesterasas (Baró-Montel et al., 2019), pectinliasas (Rodríguez-Pires et al., 2020b) y cutinasas (Lee et al., 2010) importantes en el proceso de patogénesis. Esta maquinaria enzimática trabaja de forma sinérgica, atacando los componentes de la pared celular, para degradar la superficie de la fruta y poder establecer la infección (Hall, 1971; Reignault et al., 2008). Se han descrito un total de 403 genes codificantes para CAZymes en el genoma de *M. laxa* (Rodríguez-Pires et al., 2020a). Al analizar el patrón de expresión génica de varias familias de pectinasas se descubrió un patrón temporal de activación, revelando un modo de acción secuencial para la degradación de la

pectina (Rodríguez-Pires et al., 2020a). Usando técnicas de proteómica nLC-MS/MS, se observó un grupo de proteínas marcadoras en aislados de mayor virulencia, que incluye CAZymes como MIPG1, MIPME3 o endoglucanasas, mientras que hay un grupo de proteínas secretadas compartido por aislados de diferente virulencia, donde se incluyen varios factores de virulencia muy conocidos como cutinasas, pectinliasas y proteasas ácidas (Rodríguez-Pires et al., 2020b). En *M. fructicola*, un 14% de las proteínas que se predicen como secretadas son CAZymes (122), y cuyo sustrato favorito es la pectina (Vilanova et al., 2021).

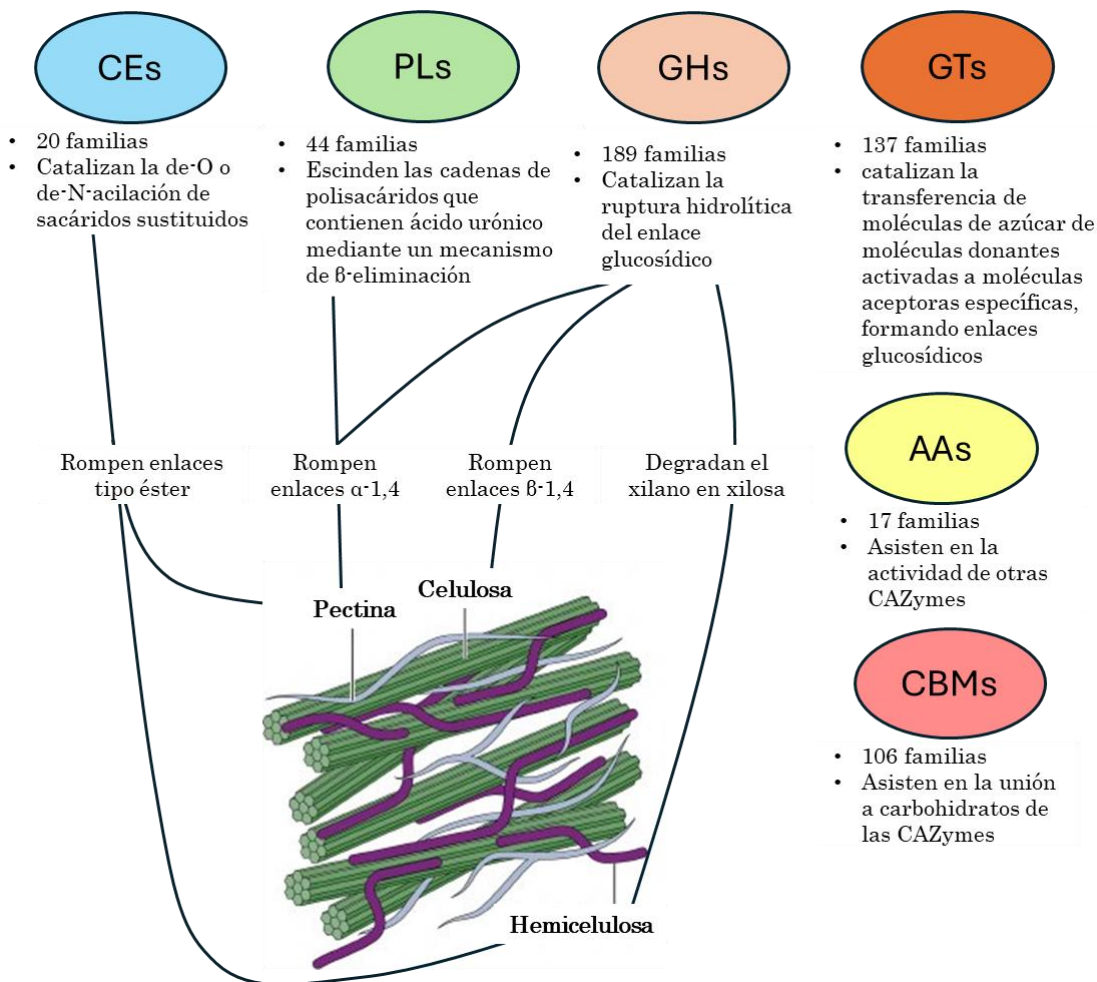


Figura 1.8. Esquema general de la actividad de las CAZymes sobre los componentes principales de la pared celular vegetal. GHs: Glicosil hidrolasas; PLs: Polisacárido liasas; CEs: Carbohidrato estereras; GTs: Glicosil transferasas CBMs: Módulos de unión a carbohidratos; AAs: Actividades auxiliares. Adaptado de (Rytioja et al., 2014).

1.5.2. NEPs y otras toxinas.

Además de las enzimas hidrolíticas necesarias para degradar la pared celular vegetal, se han descrito otros factores de virulencia para *M. laxa*, como las proteínas formadoras de poros NEP1-like (NLPs) NEP1 y NEP2, en el exoproteoma

de aislados con mayor virulencia de *M. laxa* (Rodríguez-Pires et al., 2020b). Por otro lado, metabolitos secundarios fitotóxicos, comúnmente secretados por patógenos necrotrofos (Horbach et al., 2011) como toxinas se han identificado mediante HPLC en zumo de nectarinas infectadas con las tres especies *Monilinia* causando necrosis al ser aplicadas sobre discos de nectarina tras un periodo de incubación de 24 horas (García-Benitez et al., 2019). Esta posible toxina tiene una masa molecular de entre 329 y 387 g/mol. También, recientemente se ha identificado un péptido sintasa no ribosomal (NRPS) que, en conjunto con otros genes, forman un clúster de metabolismo secundario en *M. laxa* potencialmente implicado en la producción de la toxina epipolitiidoxopiperazina (ETP) (Villarino et al., 2022), con elevada actividad transcripcional en los primeros momentos del desarrollo de la enfermedad de un aislado con alto nivel de virulencia.

Las proteínas Necrosis- and ethylene-inducing peptide 1 (Nep1, NEP1-like, NLPs) son una superfamilia de proteínas secretadas por microorganismos fitopatógenos que actúan como factores de virulencia similares a toxinas, induciendo necrosis y desencadenando una respuesta inmune por parte de la planta (Qutob et al., 2006). Son una de las mayores familias de proteínas microbianas y están ampliamente distribuidas entre microorganismos taxonómicamente no relacionados, como bacterias, hongos y oomicetos (Seidl & Van Den Ackerveken, 2019). Estas proteínas son las únicas conocidas que dañan la membrana plasmática, causando necrosis, producción de etileno y, en última instancia, apoptosis en plantas dicotiledóneas (Pirc et al., 2022, 2023).

Las NLPs son proteínas con un solo dominio, con un β -sándwich central rodeado por α -hélices, cuyos "loops" forman una cavidad central cargada negativamente en un lado de la proteína, a la que se une un catión divalente de Mg^{2+} o Ca^{2+} . Los aminoácidos encargados de la unión con el catión son imprescindibles para la virulencia de la proteína (Ottmann et al., 2009), ya que esta cavidad parece estar involucrada en el reconocimiento y unión con las glicosilinositol fosforilceramidas (GIPC) (Lenarčič et al., 2017). Aunque su existencia se conoce desde hace varias décadas (Bailey, 1995), el mecanismo molecular por el cual las NLPs dañan la membrana celular era desconocido hasta muy recientemente. Las NLPs reconocen electrostáticamente las GIPCs, unos esfingolípidos localizados exclusivamente en la membrana plasmática vegetal. A través de ellos se unen a la superficie de la membrana, se produce una agregación de subunidades de proteínas NEP1-like, y se forma un poro transitorio, causando pequeñas rupturas en la membrana que son las que causan los daños (figura 1.9) (Pirc et al., 2022).

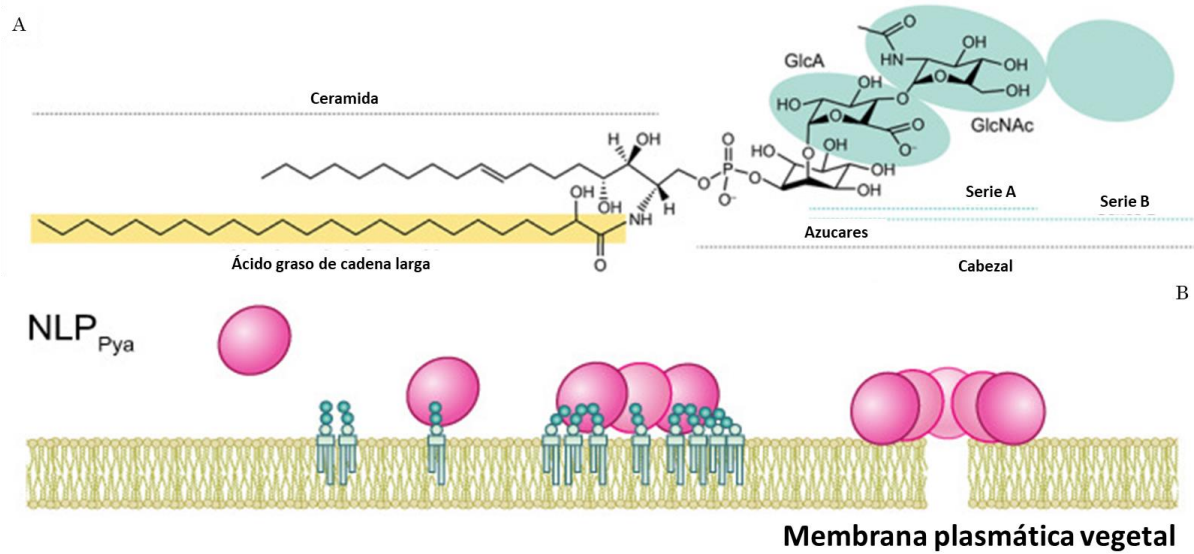


Figura 1.9. Modelo del reconocimiento específico de membrana y formación de poros por las NLPs. (A) Estructura de las GIPCs vegetales. Están compuestas por una aceramida incrustada en la membrana y un grupo de cabeza expuesto que contiene fosforil inositol unido a ácido glucurónico (GlcA) y azúcar(es) terminal(es). (B) Proceso de formación de poros por NLPs. Adaptado de Pirc et al. (2023).

1.6. Condiciones ambientales para el desarrollo de la podredumbre parda

El desarrollo y gravedad de la podredumbre parda vienen determinados por las condiciones ambientales en las que tiene lugar el proceso de infección, colonización y dispersión (Bannon et al., 2009; Garcia-Benitez et al., 2017b). Temperatura y humedad ambiente son las condiciones climáticas que más influyen al establecimiento de la enfermedad, tanto de forma individual como combinada (Bernat et al., 2017; Casals et al., 2010; Villarino et al., 2012).

1.6.1. Temperatura

Villarino et al. (2012) demostraron que existe una correlación positiva entre la incidencia de la podredumbre parda postcosecha y la temperatura, pudiendo el efecto de la temperatura ser responsable del 82% de la incidencia de la podredumbre parda en postcosecha. También la temperatura está correlacionada positivamente con el número de ramas necróticas infectadas en los huertos del Valle del Ebro (Villarino et al., 2010). Yash Gupta & Agarwala (1991) encontraron que la temperatura afecta a la incidencia de la podredumbre parda causada por *M.*

laxa en melocotones de USA. Weaver (1950) previamente demostró la existencia de una correlación directa entre la temperatura y la podredumbre parda en melocotón, siendo el rango óptimo de temperatura entre 15-25°C. A temperaturas superiores a 25°C, *M. fructicola* y *M. laxa* producen menos conidias (Phillips, 1984; Tian & Bertolini, 1999), y las conidias son menos agresivas (Phillips, 1984) que las producidas dentro del intervalo de temperatura óptima. Los últimos modelos predictivos para el desarrollo de las epidemias de *Monilinia* spp. basados en el clima sugieren que la temperatura es uno de los factores clave en el desarrollo de dichas epidemias (Bevacqua et al., 2023; Casals et al., 2023).

Altas temperaturas, superiores a 38 °C, impiden la germinación de las conidias de *Monilinia* spp., que tienen un valor óptimo para la germinación entre los 20-25 °C, mientras que las bajas temperaturas tan solo reducen la germinación sin llegar a inhibirla (Xu et al., 2001). La temperatura también afecta al desarrollo de podredumbre y del micelio, así como a la producción de esporodoquios. La temperatura óptima es de 25 °C, aunque existen diferencias a nivel de especies. *M. fructicola* está mejor adaptada a altas temperaturas, produciendo una mayor área de podredumbre sobre fruta y consiguiendo producir esporodoquios a 30 y 33 °C, mientras que *M. laxa* lo está a temperaturas más bajas, produciendo una mayor podredumbre y siendo capaz de desarrollar micelio y esporodoquios a 0 °C (Bernat et al., 2017). Tras la germinación, la temperatura juega un papel decisivo en la producción de tubos germinativos o apresorios en *M. fructicola*, produciendo el mismo número de ambos a 4 °C, y significativamente más tubos germinativos a partir de 10 °C (García-Benitez et al., 2017b).

1.6.2. Humedad

Del mismo modo que la temperatura, las precipitaciones también forman parte de los modelos predictivos como un factor clave a la hora de predecir el desarrollo de epidemias por parte de *Monilinia* spp. (Bevacqua et al., 2023; Casals et al., 2023). La humedad es también un factor limitante en el proceso de germinación de las conidias y posterior infección del fruto. Existe una correlación significativa entre las fuentes de inóculo primario y la humedad relativa de julio a febrero (ambos inclusive) de los huertos de melocotón (Villarino et al., 2010); la humedad relativa media se correlacionó negativamente con el número de frutos abortados sobre el árbol. Se ha demostrado que la cantidad de precipitación influye en el desarrollo de la podredumbre parda en el Reino Unido (Xu et al., 2007) así como sobre la tasa de pérdida de viabilidad de las conidias (Xu et al., 2001). La podredumbre parda

del cerezo causada por *M. laxa* en el Valle del Jerte (Cáceres, España) también puede predecirse mediante el número de días consecutivos con humedad relativa superior al 80% durante los meses de marzo y abril (Larena et al., 2021).

La germinación de las conidias es escasa con valores inferiores al 97% de Humedad Relativa (HR) (Xu et al., 2001), propiciando en muchos casos el estado de infección latente (Gell et al., 2008). El periodo de incubación en melocotón y cereza disminuye al aumentar el periodo de humectación (Biggs & Northover, 1988). Una vez establecida la infección, su desarrollo no parece verse afectado por la humedad ambiente sino por el contenido hídrico del propio fruto (Xu et al., 2001).

Existe una relación entre temperatura, humedad y el estado de maduración del fruto a la hora de determinar el éxito de un proceso infectivo por parte de *Monilinia* spp. Para una determinada temperatura, la incidencia de la enfermedad puede aumentar con periodos de humectación elevados (Kreidl et al., 2015). La combinación más propicia para el desarrollo de la enfermedad presenta temperaturas cálidas acompañadas de lluvias abundantes previas al periodo de cosecha y madurez del fruto (Martini & Mari, 2014).

Si las condiciones ambientales en el momento de la infección no son propicias para el desarrollo de la enfermedad o el fruto no ha alcanzado el grado de madurez adecuado, las infecciones de *Monilinia* spp. pueden quedar latentes (Gell et al., 2008). Así se puede establecer una infección latente a partir de los 8 °C y con 22 horas de humectación, existiendo una proporcionalidad inversa entre temperatura y humedad, requiriendo menos horas de humectación a temperaturas superiores (Gell et al., 2008). Estas infecciones latentes se mantienen en proceso de prepenetración, en un estado de equilibrio entre huésped, patógeno y condiciones ambientales (Gell et al., 2008). En el caso de *M. fructicola*, estas infecciones se caracterizan principalmente por la presencia de hifas en el espacio intercelular bajo la cutícula del fruto infectado, con una profundidad máxima de dos capas de células (figura 1.10) (García-Benitez et al., 2016). Estas hifas mantienen un nivel metabólico bajo y colonizan lentamente el tejido del huésped, hasta que el grado de maduración del fruto sea óptimo o las condiciones ambientales favorezcan el desarrollo de la enfermedad, en cuyo caso la infección se reactiva y da lugar a los síntomas típicos de la misma (García-Benitez et al., 2016).

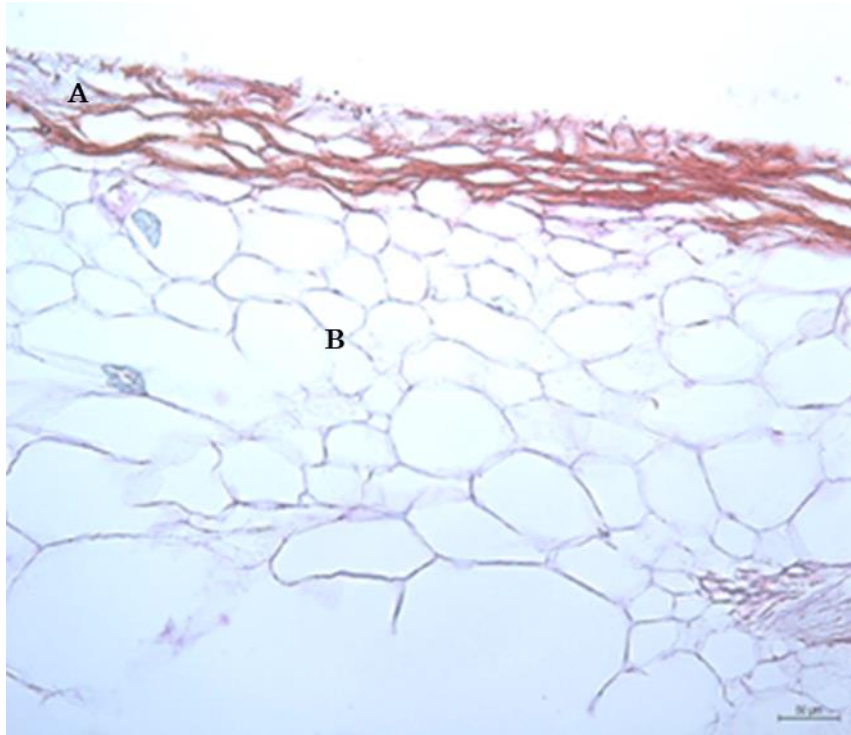


Figura 1.10. Detalle al microscopio óptico de infecciones latentes de *Monilinia fructicola* en nectarinas tras 288 horas de incubación a 4°C. (A) Hifas de *M. fructicola* y células de nectarina afectadas por la infección. Células del hongo teñidas de rojo con Safranin O-fast Green Stain. Se aprecia el colapso de algunas de las células de la epidermis y la colonización de la subdermis. (B) En azul, células de nectarina sin infección por parte de *M. fructicola*.

Se ha elaborado un modelo epidemiológico de compartimentos para describir la podredumbre parda en el Valle del Ebro incorporando tres estadios fisiológicos del cultivo: floración, fruto inmaduro y fruto maduro (Villarino et al., 2022), además de las infecciones latentes y al que habría que completar con todos los factores climáticos para ajustar un modelo de predicción. En este momento se dispone de un sistema de avisos basado en la estimación del riesgo de la enfermedad en función del estado de madurez, la variedad, la temperatura, periodo de humectación, precipitación y la presencia de inóculo en los huertos de melocotón, que permite reducir casi al 50 % el número de tratamientos fungicidas aplicados para el control de la podredumbre (Casals et al., 2023).

1.6.3. Luz

La luz, en forma de radiación solar, es también un factor ambiental que en los últimos años ha cobrado una gran importancia a la hora de comprender y predecir el desarrollo de las enfermedades vegetales, afectando tanto a la respuesta del huésped como a la virulencia de muchos patógenos (Roden & Ingle, 2009), y en

concreto a la podredumbre parda causada por *Monilinia* (Balsells-Llauradó et al., 2021; Rodríguez-Pires, Garcia-Companys, et al., 2021). El espectro de radiación solar que alcanza la superficie de la tierra comprende longitudes de onda que abarcan desde los 290 nm hasta más de 2250 nm, y se divide de la siguiente forma: un 6.8% de la energía corresponde a luz ultravioleta (UV), un 38,9% es luz visible, y el 54,3% restante es radiación infrarroja (Yung, 2003) (figura 1.11). La luz visible se extiende desde 380 nm a 830 nm. La cantidad de luz que llega en forma de radiación solar está sujeta a fluctuaciones diarias y estacionales, además de depender de la latitud terrestre (Yung, 2003). Por otro lado, factores atmosféricos como la cantidad de vapor de agua en la atmosfera o el grosor de la capa de ozono atmosférica también pueden alterar la cantidad y composición de la radiación solar que alcanza la superficie terrestre (Kotilainen et al., 2020).

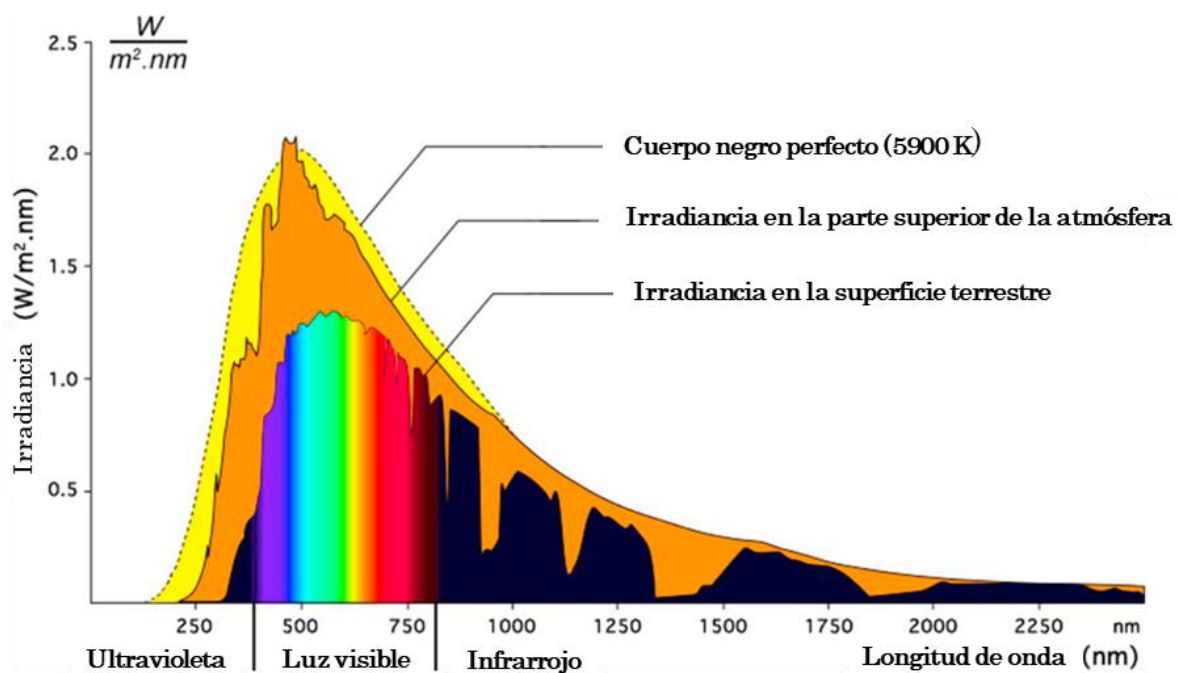


Figura 1.11. Espectro teórico del cuerpo negro y espectro solar completo en la superficie terrestre y en la parte superior de la atmósfera. La imagen está bajo una licencia internacional creative commons Attribution-ShareAlike 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>).

Los hongos filamentosos se valen de unos complejos proteicos conocidos como fotorreceptores para detectar la luz y sus fluctuaciones, que representan una fuente de información de temporalidad y orientación (Roden & Ingle, 2009). Estos fotorreceptores son asociaciones de una cadena de aminoácidos, llamada apoproteína, con un cromóforo, capaz de absorber la energía de los fotones de una

determinada longitud de onda (Schumacher, 2017). Esta absorción propicia un cambio conformacional en la apoproteína, que conduce a la transducción de señales a través de los dominios de salida, o a través de interacciones proteína-proteína (Schumacher, 2017).

Los fotorreceptores se comenzaron a estudiar en el organismo modelo *Neurospora crassa*, que utiliza el llamado complejo White Collar (White Collar Complex, WCC) para la detección de luz azul (Ballario et al., 1996). Los genes *white collar* codifican para unas proteínas que contienen un dominio Light, Voltage, Oxygen (LOV), que es miembro de una superfamilia de dominios Per, ARNT, SIM (PAS), unido a un dinucleótido de flavina adenina (FAD/FMN) (Schumacher, 2017). Las proteínas con este dominio son fotorreceptores de luz azul que se pueden distinguir en cuatro grupos: proteínas que incluyen dominios de factor de transcripción (TF) de tipo GATA (L1), dominios reguladores de la señalización de proteínas G (RGS) (L4) o proteínas sin dominio de salida evidente (L2, L3) (Schumacher, 2017). En *N. crassa* también se describió por primera vez el principal regulador del WCC, VVD1 (Schwerdtfeger & Linden, 2003). VVD1 es un fotorreceptor L4 que tiene una función antagonista al WCC, resultando en un proceso de fotoadaptación, por el cual los genes regulados por WCC dejan de activarse, aunque el estímulo luz continúe (Chen et al., 2010).

N. crassa tan solo reacciona ante la luz azul (Corrochano, 2019), pero otros hongos como *Aspergillus nidulus* o *Botrytis cinerea* cuentan con un arsenal de fotorreceptores que les permiten ver en todo el espectro de luz visible (Bayram et al., 2010; Schumacher, 2017). Estos fotorreceptores son criptocromos, fitocromos y opsinas. Los criptocromos son fotorreceptores para luz azul – ultravioleta cercano que usan un metiltetrahidrofolato (MTHF) como pigmento antena y FAD como cromóforo fotocatalítico, ambos unidos covalentemente a los dominios de unión de PHR y FAD (Schumacher, 2017). Su secuencia los hace muy similares a las fotoliasas de reparación del ADN, ganando un dominio de transducción de señal acompañado de la pérdida de la función reparadora de ADN (Cohrs & Schumacher, 2017). Los fitocromos son proteínas histidina-quinasas que además cuentan con un dominio PAS-GAF-PHY sensible a la luz, detectando el ratio entre la luz roja e infrarroja cercana (Schumacher, 2017). Por último, las opsinas son proteínas transmembrana que actúan como bombas de protones impulsadas por luz verde (Heintzen, 2012).

La información que los hongos filamentosos obtienen a través de los fotorreceptores les otorga la capacidad de adaptarse al entorno que les rodea, modificando su

morfogénesis, dispersión, ritmo circadiano y metabolismo (Bayram & Braus, 2012; Carvalho & Castillo, 2018; Schumacher & Tudzynski, 2012). La formación de esporas es un fenómeno controlado por las condiciones de iluminación en múltiples especies de hongos filamentosos. En *A. nidulans* la formación de conidias está controlada por el equilibrio entre luz de espectros rojo e infrarrojo (Mooney & Yager, 1990; Ruger-Herreros et al., 2011). La formación de conidias de *B. cinerea*, está regulada por las condiciones de iluminación, ya que el hongo sólo produce conidias bajo la presencia de luz, mientras que en oscuridad el hongo opta por favorecer la formación de esclerocios, aunque se producen más conidias en cultivos bajo un fotoperiodo de luz – oscuridad que en iluminación constante (Schumacher, 2017). Sin embargo, *B. cinerea* es incapaz de formar conidias bajo luz azul de 455 nm en fotoperiodos de 8, 16, 20 y 24 horas (Rasiukevičiūtė et al., 2021), sugiriendo que existe un complejo sistema regulatorio detrás de este proceso, involucrando los factores de transcripción BcLTF3 y BcREG1, tal y como sugieren Brandhoff y colaboradores (Brandhoff et al., 2017). Otro hongo de la familia *Sclerotiniaceae*, estrechamente relacionado con las especies de *Monilinia* es *Sclerotinia sclerotiorum*. Si bien este hongo no tiene la capacidad de producir conidias asexuales, la luz influye en el desarrollo de esclerocios y apotecios, siendo la germinación de los esclerocios mucho más rápida en condiciones de iluminación intensa (Sun & Yang, 2000).

Por otro lado, la luz también influye en la virulencia de los hongos fitopatógenos. Así determinados mutantes ciegos de *B. cinerea*, que presentan codones de stop prematuros en el gen *bcvel1*, son menos virulentos que las cepas cuyo sistema fotorreceptor está intacto, y dicha virulencia puede ser restaurada al complementar la cepa con la proteína de una cepa sin esa mutación (Canessa et al., 2013; Schumacher et al., 2012). Lo mismo ocurre con *Fusarium fujikori* y su gen homólogo de *bcltf1*, CSM1 (Niehaus et al., 2017). La familia *velvet*, como receptores, también parece estar relacionada con la patogenicidad en múltiples especies de hongos filamentosos, como en *Magnaporthe oryzae* (Kim et al., 2014), *Ustilago maydis* (Karakkat et al., 2013), *Valsa mali* (Wu et al., 2018), o *F. graminearum* (Merhej et al., 2012).

Monilinia spp., al igual que otros hongos filamentosos fitopatógenos, es capaz de recibir el estímulo luz y obtener información que puede modificar su comportamiento y adaptación a las condiciones ambientales que le rodean (Rodríguez-Pires et al., 2021a, 2021b; Verde-Yáñez et al., 2022). El patrón natural de luz-oscuridad parece necesario para desencadenar la esporulación de *M. laxa*,

relacionando el control del ciclo circadiano del hongo con su capacidad de producir epidemias, puesto que estas conidias son la principal fuente de inóculo primario y secundario del patógeno (Bannon et al., 2009; Janitor, 1970).

Se ha observado que existe cierta plasticidad fenotípica en respuesta a la luz entre las principales especies causantes de podredumbre parda en España. *M. fructicola*, *M. fructigena* y *M. laxa* (figura 1.12). Usando luz blanca, tanto la intensidad como el fotoperiodo tuvieron un efecto sobre el desarrollo de la podredumbre parda causada por *M. laxa* sobre nectarina y distintos cultivares de cereza (Rodríguez-Pires et al., 2021a). Las especies de *Monilinia* presentan diferencias en pigmentación, crecimiento y producción de conidias cuando crecen sobre medio de cultivo bajo distintas longitudes de onda. Se han utilizado las diferencias en crecimiento en medio de cultivo, de las distintas especies de *Monilinia* bajo un fotoperiodo de luz negra – oscuridad para su identificación, donde los aislados de *M. fructigena* crecían más lentamente que los de *M. fructicola* (De Cal & Melgarejo, 1999). En un estudio comparativo entre las tres especies principales de *Monilinia* presentes en España usando diferentes longitudes de onda generadas por LEDs, se encontró que *M. laxa* presenta diferencias en el color de los anillos de crecimiento, que adquieren tonos oliváceos tras exposición a diferentes luces mientras que en oscuridad predomina el color blanco en todo el micelio (figura 1.12). *M. fructicola* por otra parte, bajo luces de color blanca, azul y roja adquiere una pigmentación marrón avellana, a diferencia de las luces roja y oscuridad, que otorgan a la colonia tonos grises, lo que sugiere un cambio en el metabolismo inducido por luz. Por último, *M. fructigena* es la especie con menos variabilidad morfológica en respuesta a la luz, con colonias de color blanco y grisáceo en todas las condiciones lumínicas (Verde-Yáñez et al., 2022). Al comparar la tasa de crecimiento entre las tres especies en medio de cultivo, se encontró que en *M. fructicola* ésta sólo disminuye de forma significativa bajo longitud de onda de luz roja cercana, mientras que en condiciones de luz negra su tasa de crecimiento aumenta. En *M. laxa* se observa que bajo longitud de onda de luz roja lejana la tasa de crecimiento aumenta significativamente a la vez que disminuye tras la exposición del hongo a luz azul. En contraste, no se observaron diferencias estadísticas para *M. fructigena* (figura 1.12) (Verde-Yáñez et al., 2022). Debido a que *M. fructigena* mostró una total incapacidad para producir conidias, la formación de conidias sólo fue cuantificada para *M. laxa* y *M. fructicola*, encontrando que *M. laxa* produce una mayor cantidad de conidias que *M. fructicola* salvo bajo luz roja lejana tras ser cultivadas durante 7 días bajo un fotoperiodo de

16 h de luz a 20 °C (Verde-Yáñez et al., 2022). También se han descrito diferencias de tasa de crecimiento y esporulación por efecto de la luz entre distintos aislados de *M. laxa* (Rodríguez-Pires et al., 2021b). En un estudio que compara el crecimiento de tres aislados de *M. laxa* bajo dos fotoperiodos de 8 y 16 h de luz de distintas longitudes de onda generadas por tubos fluorescentes, donde se observa una mayor tasa de crecimiento miceliar bajo luz roja para los tres aislados de *M. laxa*, seguida de la luz verde, la luz diurna y la oscuridad. Sin embargo, sólo se observaron un aumento de la producción de conidias con la luz diurna, la luz negra y la luz verde con el fotoperiodo de más horas de exposición a la luz. (Rodríguez-Pires et al., 2021b). Estos resultados sugieren la existencia de diferencias a nivel regulatorio en el proceso de fotorrecepción dentro del género *Monilinia* spp.

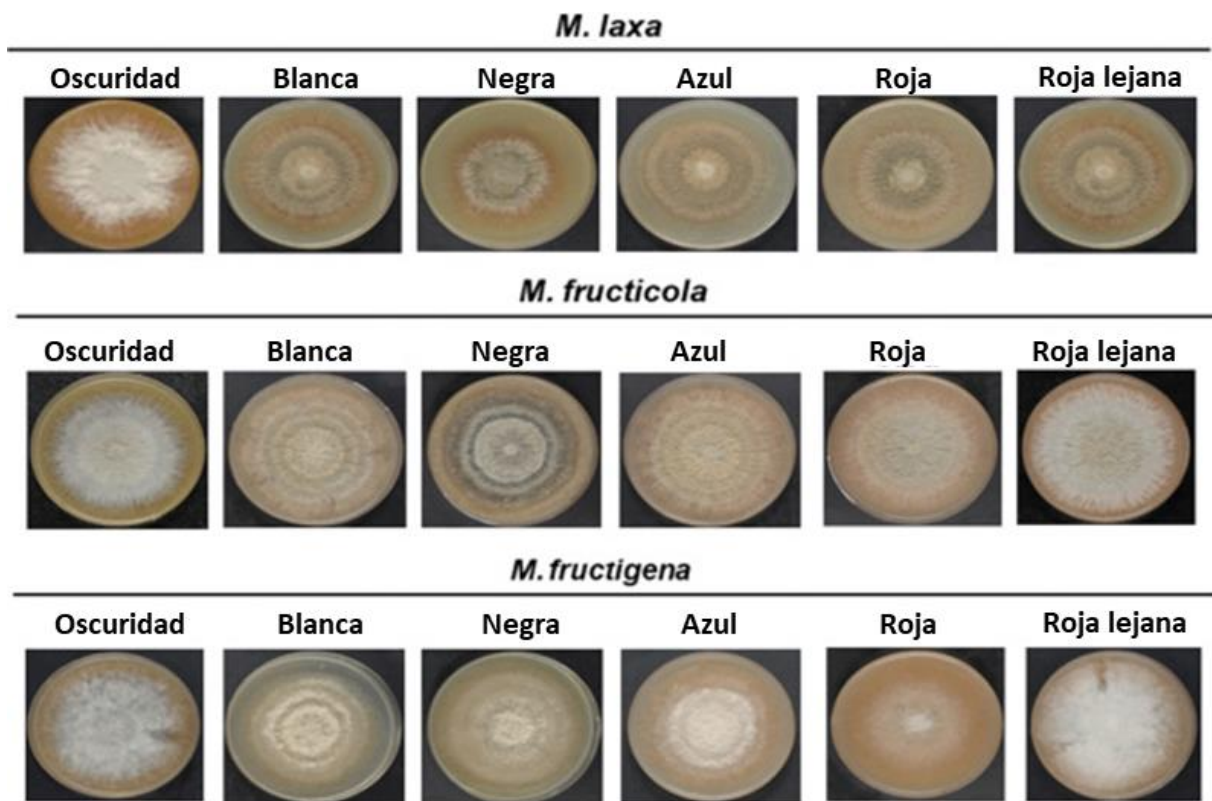


Figura 1.12. Plasticidad fenotípica de *Monilinia* spp. ante estímulos de luz de longitudes de onda diferentes. Se observan diferencias fenotípicas entre especies y dentro de la misma especie de *Monilinia* en respuesta a luz blanca, negra (ultravioleta cercano), azul, roja y roja lejana) Adaptado de Verde-Yáñez et al. (2022).

Para entender la respuesta activa a la luz por las distintas especies de *Monilinia*, se han realizado búsquedas de los genes codificantes de los principales fotorreceptores en sus genomas. En *M. laxa* se han identificado por similitud de secuencias un set de proteínas fotorreceptoras muy similares a los presentes en otros hongos de la familia *Sclerotiniaceae*, como *B. cinerea* (Rodríguez-Pires et al., 2021b). Para la recepción de luz azul, *M. laxa* cuenta con dos grupos de proteínas

candidatas, criptocromos y *White Collar*; para la recepción de luz roja tiene a su disposición la familia de los fitocromos, mientras que para la luz verde cuenta con la familia de las opsinas (figura 1.13) (Rodríguez-Pires et al., 2021b).

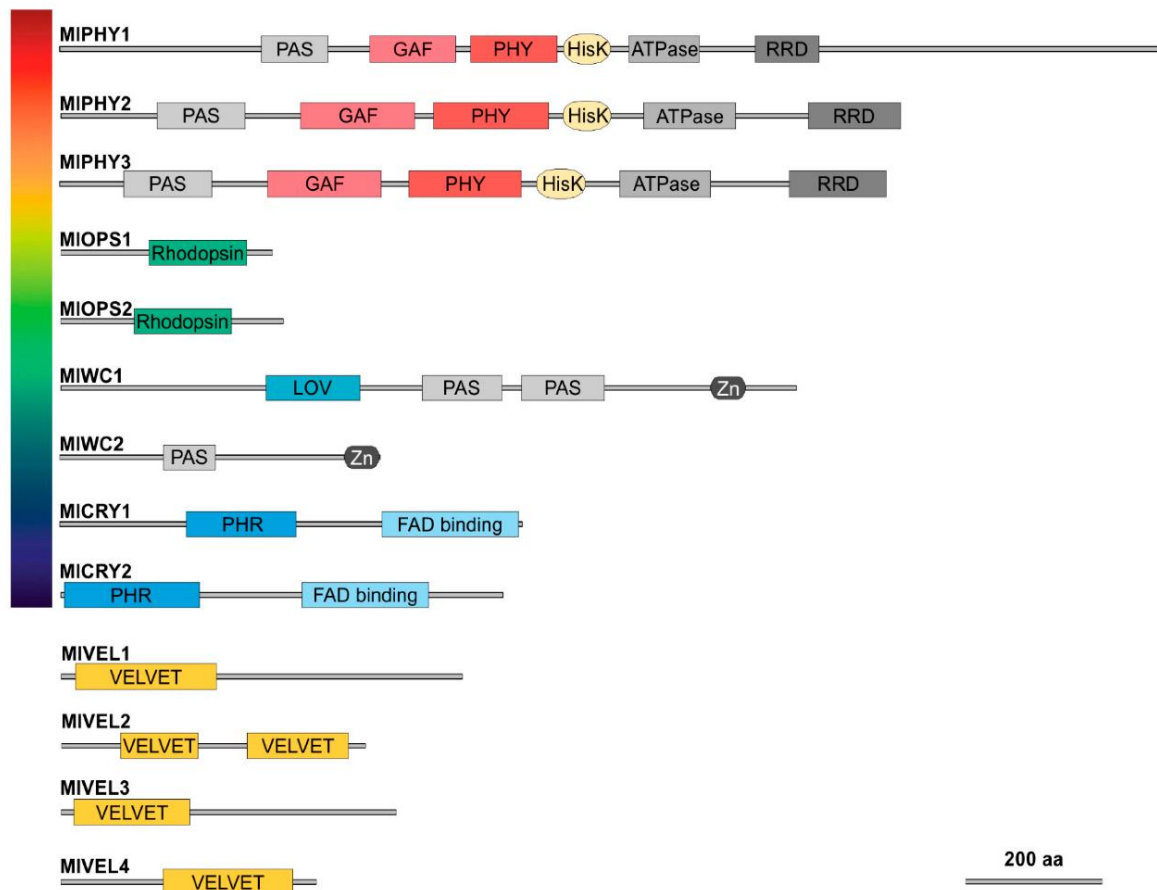


Figura 1.13. Sistema fotorreceptor y proteínas asociadas descrito en *M. laxa*. (Rodríguez-Pires et al., 2021b).

Uno de los objetivos de esta tesis es identificar y describir la maquinaria fotorreceptora codificada en los genomas de *M. fructicola* y *M. fructigena*, y si las diferencias en comportamiento frente a la luz de *Monilinia* spp responden a diferencias en dicha maquinaria o a diferencias en el sistema regulatorio y su relación con la virulencia de cada una de las especies.

Como hemos comentado con anterioridad, existe una relación entre el desarrollo de la podredumbre parda causada por *Monilinia* y las condiciones de iluminación en las que se encuentre el hongo. Por el momento se ha reportado un aumento de la virulencia en nectarinas inoculadas con *M. laxa* e incubadas en fotoperiodo de 12 horas bajo luz blanca respecto al control oscuridad, así como en cerezas

infectadas e incubadas bajo luz blanca de alta intensidad (Rodríguez-Pires et al., 2021a). En este mismo estudio se establece una relación entre la virulencia y la regulación del gen MIPNL2. También existe un incremento de incidencia y gravedad de la enfermedad en nectarinas inoculadas con *M. laxa* al incubarse en luz roja (Rodríguez-Pires et al., 2021a). Sin embargo, en un estudio por parte de Balsells-Llauradó y colaboradores (2021), se describe cómo *M. laxa* 8L se vuelve menos virulento tras tratamientos con luz de alta y baja intensidad, mientras que no se observaron estos efectos para *M. fructicola* CPMC6. Por otro lado, (Verde-Yáñez et al., 2022) reportó que la virulencia de la enfermedad se reduce en nectarinas inoculadas artificialmente con *M. laxa* y *M. fructicola* e incubadas bajo luz negra. Sin embargo, este fenómeno no se observa en *M. fructigena*.

En esta Tesis se predecirá los CAZomas e se identificarán las posibles NLPs existentes en los genomas de las tres especies de *Monilinia*, comparando su estructura y secuencia entre las distintas especies, y con los existentes de *M. laxa*, lo que permitirá conocer las diferencias entre todas ellas y el efecto que esto pudiera tener sobre el desarrollo de la enfermedad. Otro de los objetivos será comprender el efecto que tienen diferentes condiciones de iluminación sobre el desarrollo de la enfermedad y la regulación de los factores de virulencia y fotorreceptores durante los primeros estadios de la infección sobre nectarina por parte de *Monilinia* spp.

2. Objetivos

Esta tesis doctoral aborda la interacción nectarina-*Monilinia* spp. y su relación con la luz a la hora de regular el proceso de patogénesis. Por ello, los objetivos que se plantean en la tesis son los siguientes:

1. La descripción del efecto de la luz sobre el desarrollo de la enfermedad y el crecimiento de la especie *Monilinia fructicola* y sus fotoreceptores.
2. Efecto de la luz roja sobre la podredumbre parda causada por *Monilinia fructicola* e identificación de genes relacionados con la patogenicidad: la familia CAZyme y las toxinas formadoras de poros.
3. Efecto de la luz sobre la patogénesis de *Monilinia fructigena*. Base genética de la respuesta a la luz.
4. Realizar un estudio comparativo del comportamiento de las tres principales especies de *Monilinia* en huertos de España en los procesos tempranos de infección sobre nectarina.

3. Metodología

3.1. Material biológico

3.1.1. Cepas de *Monilinia* spp.

En esta tesis se han usado tres aislados pertenecientes a tres especies distintas de *Monilinia* para evaluar el efecto de distintas longitudes de onda y fotoperiodos sobre: a) el crecimiento y esporulación del hongo, b) el desarrollo de la enfermedad durante los primeros instantes de infección, y c) la expresión génica de genes codificantes para factores de virulencia y fotorreceptores. Estos aislados son *M. fructicola* 38C, *M. laxa* 8L y *M. fructigena* Mgena6. Estos aislados están depositados en la Colección Española de Cultivos Tipo bajo los números de identificación CECT 21105 (*M. fructicola* 38C), CECT 21100 (*M. laxa* 8L) y CECT 21206 (*M. fructigena* Mgena6).

Los genomas de las tres especies están disponibles en el NCBI con los siguientes números de acceso: GCA_023158975.1 (*M. fructigena* Mgena6, BioProject: PRJNA707424), GCA_002938945.1 (*M. laxa* 8L, Naranjo-Ortíz et al., 2018) y GCA_016906325.1 (*M. fructicola* 38C, Vilanova et al., 2021). Adicionalmente, se empleó la cepa *M. fructicola* 1C como control de crecimiento y esporulación en medio de cultivo sólido.

3.1.2. Fruto huésped

Para evaluar los efectos de distintas longitudes de onda sobre el desarrollo de la podredumbre parda causada por *Monilinia* spp., se realizaron ensayos de infección usando como huésped frutas de nectarina (*Prunus persica* var. *nucipersica*) de la variedad comercial Red Jim. Estos frutos fueron cosechados en la región española del valle del Ebro (Lleida, España), en condiciones óptimas de madurez comercial, durante las primeras semanas de agosto de 2020 y 2021.

3.2. Condiciones de crecimiento

Los distintos aislados de *Monilinia* se almacenaron a largo plazo usando una suspensión de conidias en glicerol al 20% y congelándolos a -80 °C. Para almacenaje

a corto plazo, se usaron cultivos en agar dextrosa de patata (PDA, Difco™, Nueva Jersey, EE. UU) mantenidos en la oscuridad a 4 °C. *M. fructigena* Mgena6 sólo se almacenó en cultivos sobre PDA a 4 °C. Para la producción de conidias, *M. fructicola* 38C se cultivó sobre PDA e incubó a 25 °C durante 7 días en oscuridad continua. *M. laxa* 8L se cultivó sobre PDA enmendado con un 20% de pulpa de tomate a 22 °C durante 7-9 días con un fotoperiodo de luz blanca a 12 h. No se pudo obtener conidias de *M. fructigena* Mgena6 y se cultivó sobre PDA e incubó a 25 °C durante 7 días en oscuridad continua.

3.3. Condiciones de iluminación

Para la generación de luz blanca de espectro completo se usaron tubos fluorescentes Osram 58W/840 “Cool White” y Osram 36W/954 “daylight”. Para la generación de luz de distintos colores se usaron fluorescentes Sylvania F36W/T8/Red (luz roja), Sylvania F36/T8/B (luz azul), Sylvania F36W/T8/G (luz verde), y TL-D Philips 36W (luz ultravioleta cercano). Las características técnicas de estos sistemas de iluminación se describen en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Características de los tubos fluorescentes usados en esta tesis.

Nombre comercial	Color	Iluminancia (lx)	Irradiancia (W/m ²)	Longitud de onda (nm)	Flujo luminoso (lm)
Osram 58W/840	Blanco “cool light”	14900	165.5	300-700	5200
Osram 36W/954	Blanco “daylight”	8700	110.13	300-700	2850
Sylvania F36W/T8/Red	Rojo	175	90.2	620-700	70
Sylvania F36/T8/B	Azul	2780	143.3	400-520	700
Sylvania F36W/T8/G	Verde	7400	84.7	480-600	3140
TL-D Philips 36W	Ultravioleta cercano	40	-	340-400	-

3.4. Ensayos de crecimiento y esporulación

Para evaluar el efecto de distintas longitudes de onda y fotoperiodos sobre el crecimiento y esporulación de *Monilinia* spp., se llevaron a cabo experimentos en placas Petri conteniendo PDA e inoculadas con 15 μ l de suspensión de 10^6 conidias/ml de *M. fructicola* 38C, o bien con discos miceliales de PDA de 0,5 cm de diámetro procedentes de colonias de 7 días de incubación de *M. fructigena* Mgena6. A continuación, todas las placas se incubaron durante 7 días en cámaras de crecimiento a 22-25 °C utilizando 2 fotoperiodos diferentes: 8 h de luz / 16 h de oscuridad y 12 h de luz / 12 h de oscuridad, manteniendo 25 cm entre los tubos fluorescentes y las placas. Para estos experimentos se utilizó iluminación con los tubos Osram 36W/954, Sylvania F36W/T8/Red, Sylvania F36/T8/B, Sylvania F36W/T8/G y TL-D Philips 36W. El grupo control se mantuvo en oscuridad total. Se midieron dos diámetros perpendiculares cada día en cada placa a partir del tercer día de cultivo y se calculó la velocidad de crecimiento diaria (mm/día) de cada especie mediante un análisis de regresión al final del experimento. La esporulación total se calculó al final de los experimentos, raspando la superficie de las colonias individualmente tras añadir 5 ml de agua destilada estéril. Posteriormente se filtró con lana de vidrio para eliminar restos de micelio y el número de conidias producidas fue determinado usando un hemocitómetro. La producción de conidias por cada placa se expresó como el número total de conidias producidos por el área de la colonia (conidias/cm²). Se usaron 5 réplicas por cada condición y aislado y el experimento completo fue repetido 2 veces.

3.5. Ensayos de infección sobre fruta

Para la evaluación del efecto de luces de distinta longitud de onda en el desarrollo de la podredumbre parda se hicieron ensayos sobre fruta (nectarinas), desinfectadas siguiendo un protocolo de hipoclorito sódico descrito por Sauer & Burroughs (1986). Se utilizaron tres gotas de una suspensión de 10^6 conidias/ml para inocular la fruta con *M. fructicola* 38C o *M. laxa* 8L, mientras que para inocular *M. fructigena* Mgena6 se utilizaron tres discos miceliales de PDA de 0,5 cm de diámetro, provenientes de colonias de 7 días de incubación. A continuación, la fruta se colocó en alveolos de celulosa esterilizadas dentro de bandejas de plástico desinfectadas que contenían papel humedecido para conservar la humedad. Cada bandeja se selló con “film” de plástico transparente y se mantuvo en oscuridad en cámaras de crecimiento a 25 °C durante 24 h para permitir la

germinación de las conidias, y después durante 14 h bajo exposición directa a la luz. En estos experimentos se usaron los tubos fluorescentes Osram 58W/840, Sylvania F36W/T8/Red, Sylvania F36/T8/B, Sylvania F36W/T8/G y TL-D Philips 36W. Se estableció un grupo control en oscuridad total. Se utilizaron tres frutos por especie y condición de luz y todo el experimento se repitió dos veces. El inicio de los síntomas de la enfermedad se midió tras 14 horas de exposición directa a la luz.

Durante el desarrollo de los ensayos de infección sobre fruta se recogieron muestras de material biológico que posteriormente serían usadas en los análisis de expresión génica. Dichas muestras consistieron en recortes de 1 cm² de piel de nectarina infectada, obtenida con bisturí, correspondientes a los sitios de inoculación con el hongo. Se recogieron muestras tras pulsos de luz de 5 min, 1 h, 2.5 h, 5 h y 14 h de duración.

3.6. Ensayos de expresión génica en distintos medios de cultivo

Se evaluó el efecto de las luces roja y azul en la expresión de un grupo selecto de CAZymes por parte de *M. fructicola* 38C al crecer sobre distintos medios de cultivo. Estos medios de cultivo fueron: *Potato Dextrose Broth* (PDB), agua destilada estéril complementada con un 1% (por peso) de piel de nectarina liofilizada y pulverizada (1% nectarine) y nectarinas variedad Red Jim cosechadas en estado óptimo de madurez comercial.

Matraces de cristal conteniendo 20 ml de cada medio de cultivo líquido fueron inoculados con conidias de *M. fructicola* 38C hasta una concentración final de 10⁶ conidias/ml e incubados en oscuridad a 22 °C durante 24 h en agitación a 150 rpm para permitir la germinación de las conidias. A continuación, se sometieron a pulsos de luz de duración creciente de 5 min, 1 h, 2.5 h, 5 h y 14 h usando para ello los tubos fluorescentes F36W/T8/Red y Sylvania F36/T8/B. El micelio se recolectó por centrifugación del contenido de los matraces a 12000 rpm durante 15 min a 4 °C, descartando el sobrenadante e inmediatamente congelando el “*pellet*” en nitrógeno líquido hasta su posterior uso. Se usaron 3 muestras por tiempo y condición de luz, y el grupo control se mantuvo en oscuridad total. Para la obtención de muestras de fruta se siguió el protocolo anteriormente explicado.

3.7. Análisis de expresión génica

3.7.1. Extracción de ácidos nucleicos

Para la extracción de ARN total de las muestras biológicas obtenidas en los distintos ensayos se siguieron dos protocolos, atendiendo a la naturaleza de dichas muestras. En ambos casos, las muestras fueron primero homogeneizadas en nitrógeno líquido usando un mortero y pistilo

Para las muestras de micelio obtenido de medio de cultivo líquido PDB se siguió un protocolo basado en el reactivo TRIreagent previamente descrito por Espeso et al. (2019). En el caso de las muestras que contenían piel de nectarina, al contener una gran concentración de compuestos fenólicos, se hizo necesario seguir un protocolo basado en CTAB descrito por Gambino et al. (2008) y adaptado a *Monilinia* spp. por Rodríguez-Pires et al. (2021a).

En ambos casos, la concentración y la pureza del ARN se midieron con un espectrofotómetro NanoDrop 2000 y la integridad del ARN se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,2%.

3.7.2. RT-qPCR

Antes de llevar a cabo las reacciones de PCR en tiempo real (RT-qPCR), es necesario sintetizar ADN complementario al ARN que se va a utilizar (ADNc). Antes de la síntesis de ADNc, las muestras de ARN total se trataron con DNasa I (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADNc se sintetizó a partir de 1 µg de ARN tratado con DNasa utilizando el sistema de síntesis First-Strand SuperScript para RT-PCR y el cebador oligo(dT) siguiendo las indicaciones del fabricante. Las RT-qPCR se realizaron en un termociclador 7500 Fast Real-Time PCR utilizando el reactivo GoTaq qPCR Master Mix (Promega). Se analizaron tres réplicas técnicas por cada réplica biológica, con un volumen total de 20µL, que contenía 10µL de 2×GoTaq qPCR Master Mix, 7,8µL de agua libre de nucleasa, 300 nM de cada cebador y 100 ng de ADNc. El programa de ciclado fue de 2 min a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 15 s a 95 °C y 1 min a 60 °C. Tras la reacción de amplificación, se realizó un análisis de la curva de fusión para comprobar la especificidad de los cebadores. Todos los cebadores usados para RT-qPCR están descritos en la tabla 3.2.

Tabla 3.2. Cebadores usados en esta tesis.

Gen	Especie	Nombre	Secuencia	
			Forward	Reverse
Histona H3	General	Mh3	TCCGTCGTTACCAAAAGTCG	GGCGAGTTGGATGTCCTTAG
<i>cry1</i>	<i>M. fructicola</i>	Mfcry1	CAATAGAGGAAGAGGTGGTGGAG	TTCCAGTTCGCAACTCCCTTC
<i>cry2</i>	General	Mcry2	TGGGCTTTATTGATGCCTCG	CCTGCAACATATTGCCAATTACC
<i>phy1</i>	General	Mphy1	GGAGAAGAATGTGCAAGTGCCTA	CGTTCGACAAGAGAGGCTGATAC
<i>phy2</i>	General	Mphy2	ATGGTCAAGGGCGATGCTACT	GGCCAACACCGAGAGTCTCTC
<i>phy3</i>	<i>M. fructicola</i>	Mfcphy3	ATAAACACTGAGCCAGGGCATG	CGGGCGACTCAATTATTTCTGT
<i>op1</i>	General	Mop1	TCTTCGCTGCTTACCACAACG	ACCTCAGAATCAACCGACCATG
<i>op2</i>	General	Mop2	CTAGCCAAGATTGGCTTCGGT	ATCGTTGGCAGGATTATTCGAG
<i>vvd1</i>	General	Mvvd1	ATTGCAGATTCTACAACAGCC	GCTTGAAATCCGACCACATAAT
<i>far1</i>	General	Mfar1	GGCTCTGGTAGTACCTCCACCC	TCCACATAGATCCCACAAACCC
<i>wcl1</i>	<i>M. fructicola</i>	Mfewcl1	AACATTAGTCCAGGAAACGCGA	TCTCGCATGAACTGGTTGACTT
<i>wcl2</i>	General	Mwcl2	GCACGTTGACAAAGGCCAAC	GCGCCATTCAGGTGAATCC
	<i>M. fructicola</i>	Mfenep1	TGAAGAAGAACACCAACCCACC	TGAATGGGCAGACAGCGC
<i>nep1</i>	<i>M. fructigena</i>	Mfenep1	TGAAGAAGAACACCAACCCACC	TGAATGGGCAGACAGCGC
	<i>M. laxa</i>	Mfenep1	TGAAGAAGAACACCAACCCACC	TGAATGGGCAGACAGCGC
	<i>M. fructicola</i>	Mfenep2	GCACCAGCCCCTCATCAAG	GGTTGGTGTGTAAGTTGGCG
<i>nep2</i>	<i>M. fructigena</i>	Mfenep2	GCACCAGCCCCTCATCAAG	GGTTGTTGTGCGAAGTTGGCATC
	<i>M. laxa</i>	Mfenep2	GGTTACTCCCTCTCCGGCAC	GAAGTTGGCGTCCTTGAAAG
<i>pnl1</i>	General	Monpnl1	TCGTTTCGGTACTGCTCACATC	CTGCCAGTCAACGTACCCTTAA
<i>pnl2</i>	General	Monpnl2	TCCTCCACGCTGTCAACAACCT	CACCAGAAGAACCGAAAACCG
<i>pg1</i>	General	Monpg1	CCAAGTACGGTGTGTGTCATCCA	TTGACACCAGATGGGAGACCA
<i>pg6</i>	General	Monpg6	TGCTTTGGAGGTCATGGTCTAAG	TCTCCAGTTGGACCTCCGTT

<i>cel1</i>	General	Moncel1	GTGGTGCTGGACCAATCTCAA	GTACCAGCTTGGATTGTTGTGAG
<i>pme2</i>	General	Monpme2	GCCATCACCGCCTCTGGT	GTAGAGGTGGACCATTGTTCCC
<i>pme3</i>	General	Monpme3	GTGCCGGATCTGTCTACCTTG	CCCAGGTCTTGTAGTTGCTACCC
<i>cut1</i>	General	Moncut1	TCCGGTTACTCCCAAGGAGG	CGTGACAGATGATCTTGGTCTTTG

3.7.3. Secuenciación de ARN (RNAseq)

ARN total, extraído de las muestras de nectarina infectada con *M. fructicola* 38C y *M. fructigena* Mgena6 en oscuridad y tras pulsos de luz de 5 minutos y 14 h, fue enviado para secuenciar a MacroGen usando tecnología Illumina y un kit de preparación de librerías TruSeq Stranded mRNA (Illumina). Se enviaron 3 réplicas biológicas por aislado, tiempo y condición lumínica y se generaron archivos “*Raw Data*” en formato .fastq conteniendo lecturas “*paired end*” de 151 pb con los adaptadores sin eliminar.

3.8. Herramientas bioinformáticas

3.8.1. Predicción de proteomas

La predicción del proteoma de las tres especies de *Monilinia* se realizó con el servicio en línea WebAUGUSTUS (Hoff & Stanke, 2013) utilizando la configuración predeterminada, *B. cinerea* como modelo de entrenamiento y la secuencia genómica disponible de *M. fructicola* 38C, *M. laxa* 8L y *M. fructigena* Mgena6.

3.8.2. Anotación funcional de Gene Ontology e identificación de genes de interés

La anotación funcional por “*Gene Ontology*” (GO) se llevó a cabo usando el programa OmicsBox 3.0.30 (Götz et al., 2008) y los proteomas predichos de cada especie de *Monilinia*.

En el caso de la identificación y anotación de genes codificantes para CAZymes se realizaron consultas en la base de datos dbCAN3 (Zheng et al., 2023) y los proteomas predichos en cada especie de *Monilinia*.

Las proteínas NEP1-like se identificaron en los proteomas predichos de *Monilinia* spp. utilizando la anotación funcional generada con el programa OmicsBox 3.0.30 (Götz et al. 2008) y se confirmaron mediante una búsqueda BlastP en la base de datos UniProt (consultada el 23 de junio de 2023) del siguiente polipéptido: «AIMYSWYFPKDPSTDFGHRHDWE», como se describe en S. Schumacher et al. (2020). Los péptidos señal para todos los NLPs se identificaron utilizando SignalP 6.0 (Teufel et al., 2022).

Por último, los genes codificantes para proteínas fotorreceptoras se identificaron usando la anotación funcional generada con el programa OmicsBox y la herramienta BLAST incluida en el software NCBI Genomic Workbench (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/gbench/>), apoyándonos en la lista de fotorreceptores descrita para *M. laxa* 8L por Rodríguez-Pires et al. (2021b).

3.8.3. Construcción de árbol filogenético

La historia evolutiva de la proteína FAR1 se analizó mediante la construcción de un árbol filogenético realizado siguiendo el método de máxima verosimilitud (Maximum Likelihood, ML) y el modelo Jones-Taylor-Thorton (JTT) usando para ello el programa MEGA X (Kumar et al., 2018). Se seleccionaron 46 secuencias aminoacídicas pertenecientes a distintas especies dentro de la clase *Leotiomycetes* obtenidas de la base de datos InterPro (consultada en diciembre de 2022; Paysan-Lafosse et al., 2023).

3.8.4. Análisis transcriptómicos de expresión diferencial

Estos análisis se llevaron a cabo usando múltiples herramientas incluidas en el programa CLC Genomic Workbench 22.0.3 (<https://digitalinsights.qiagen.com>). Los archivos formato *.fastq proporcionados por MacroGen con las lecturas en crudo fueron limpiados para eliminar adaptadores. A continuación, las lecturas se mapearon con el genoma disponible de *Prunus persica* para seleccionar las lecturas específicas de hongos y almacenarlas en un archivo de lecturas sin mapear. Este archivo se utilizó posteriormente para el mapeo específico de las lecturas con el genoma disponible de *M. fructicola* 38C o *M. fructigena* Mgena6 utilizando CLC Genomics Workbench 22.0.3. Se realizaron análisis de componentes principales (PCA) para evaluar preliminarmente las diferencias en la expresión génica global normalizada entre las muestras. Los análisis de expresión diferencial entre muestras se realizaron utilizando la oscuridad como grupo de control, considerando

que un transcrito se expresaba diferencialmente cuando el valor absoluto del Log_2 de la variación en los niveles de expresión encontrados ($\text{Log}_2 \text{FC}$) era superior a dos, tenía un valor $p\text{-FDR} < 0,05$ y tenía un valor TPM superior a 20 en al menos una condición.

3.8.5. Análisis de enriquecimiento en términos GO

Los análisis de enriquecimiento en términos GO fueron realizados usando la herramienta “*Gene Set Test*” incluida en el software CLC Genomics Workbench 22.0.3, las anotaciones funcionales generadas con OmicsBoxes y los resultados de los análisis de expresión diferencial entre muestras. Los parámetros para definir un gen expresado diferencialmente (DEG) fueron un valor absoluto de $\text{Log}_2 \text{FC}$ superior a dos y un valor $p < 0,05$.

3.8.6. Diseño de cebadores

Una vez los genes de interés fueron identificados y seleccionados, la secuencia genómica de las 3 especies se comparó usando MEGA X para seleccionar posibles regiones idénticas entre las tres especies en las que diseñar los cebadores. Dichas regiones, para ser consideradas adecuadas, debían encontrarse en el extremo 3' del gen. En caso de no encontrar una región adecuada se diseñaron cebadores para cada especie de *Monilinia* de forma individual. Los cebadores se diseñaron usando el programa Vector NTI, con una T_m en torno a los 55 °C, un %GC en torno al 50%, una longitud aproximada de 20 pb y un produciendo un amplicón entre 200-300 pb.

3.8.7. Visualización y predicción de estructuras 3D

El modelo de estructura 3D de las NLPs se obtuvo de la base de datos AlphaFold (Jumper et al., 2021; Varadi et al., 2022; consultada en enero de 2024). Se utilizó el programa PyMOL Molecular Graphics versión 2.0 para visualizar y resaltar los cambios de aminoácidos en la estructura 3D de NEP1 y NEP2. La predicción de estructuras de oligómeros de proteínas se realizó en el servidor ColabFold AlphaFold-Multimer con la configuración predeterminada, se generaron 5 modelos a partir de cada predicción y cada modelo se recicló tres veces; el mejor modelo basado en la prueba de diferencia de distancia local predicha (pLDDT) se trazó para cada predicción junto con su matriz de error de alineación predicha (PAE) (Jumper et al., 2021; Mirdita et al., 2022).

3.8.8. Comparativa de ORFs y promotores

Se utilizó el programa GeneDoc para construir los alineamientos de secuencias por pares de las regiones promotoras y ORF de *nep1* y *nep2* en 38C, 8L y Mgena6. Las búsquedas de motivos en la secuencia promotora de *nep1* y *nep2* se realizaron con CLC Genomics Workbench 22.0.3

3.9. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el programa Statgraphics Centurion 19.0 (<https://www.statgraphics.com/>). Los datos se analizaron mediante la prueba de ANOVA. Las comparaciones entre grupos se realizaron con las pruebas de rangos múltiples de Student-Newman-Keuls o Tukey para la velocidad de crecimiento diario en placas y producción de conidias. Se utilizó la prueba de comparación múltiple de Bonferroni para realizar comparaciones entre grupos en los experimentos de infección en fruta.

Los niveles de expresión génica se calcularon mediante el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ con la histona H3 como gen de control interno (Schmittgen & Livak, 2008). Los análisis de expresión diferencial entre muestras se realizaron utilizando la oscuridad como grupo de control, considerando que un transcrito se expresaba diferencialmente cuando el valor absoluto del Log_2 de la variación en los niveles de expresión encontrados ($\text{Log}_2 \text{FC}$) era superior a dos. Las comparaciones entre grupos se realizaron con la prueba de rangos múltiples de Student-Newman-Keuls tras el análisis de ANOVA.

3.10. Metodología específica para cada uno de los objetivos

En las figuras 3.1 a 3.4 se recoge de forma esquemática la metodología y flujo de trabajo empleados para lograr la consecución de los 4 objetivos presentes en esta tesis.

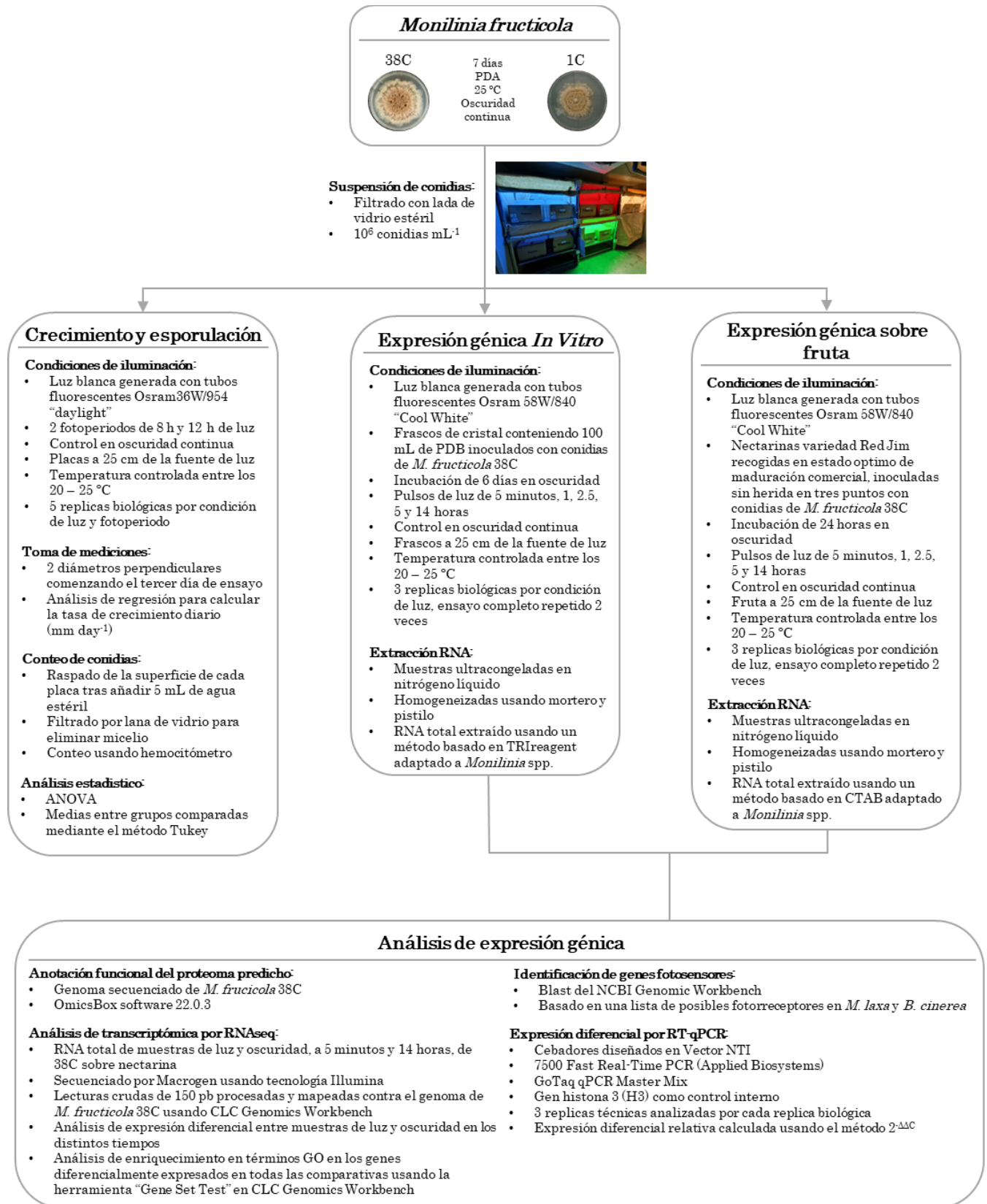


Figura 3.1. Representación esquemática de la metodología empleada para cumplir con el objetivo 1 presentado en esta tesis.

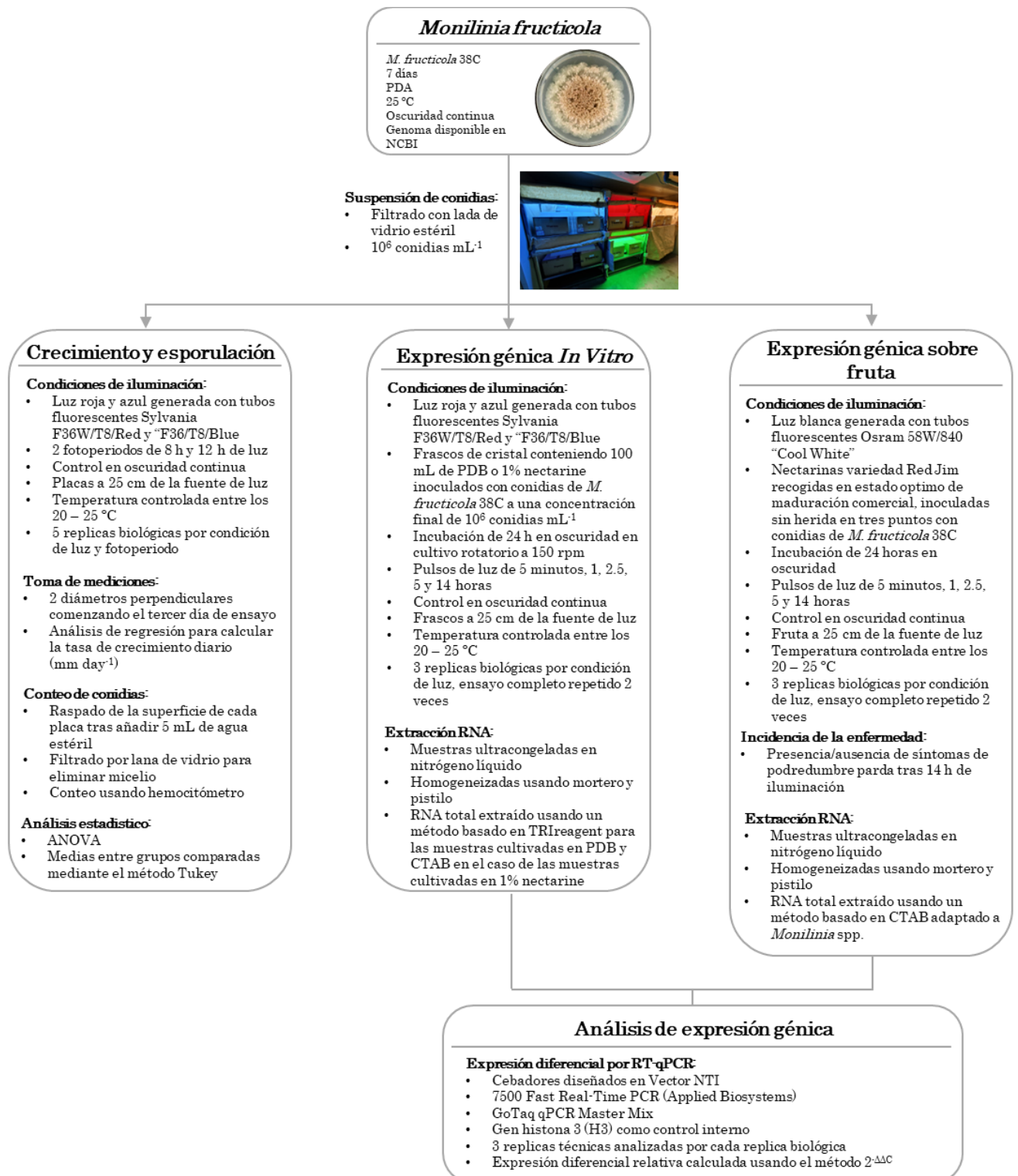


Figura 3.2. Representación esquemática de la metodología empleada para cumplir con el objetivo 2 presentado en esta tesis.

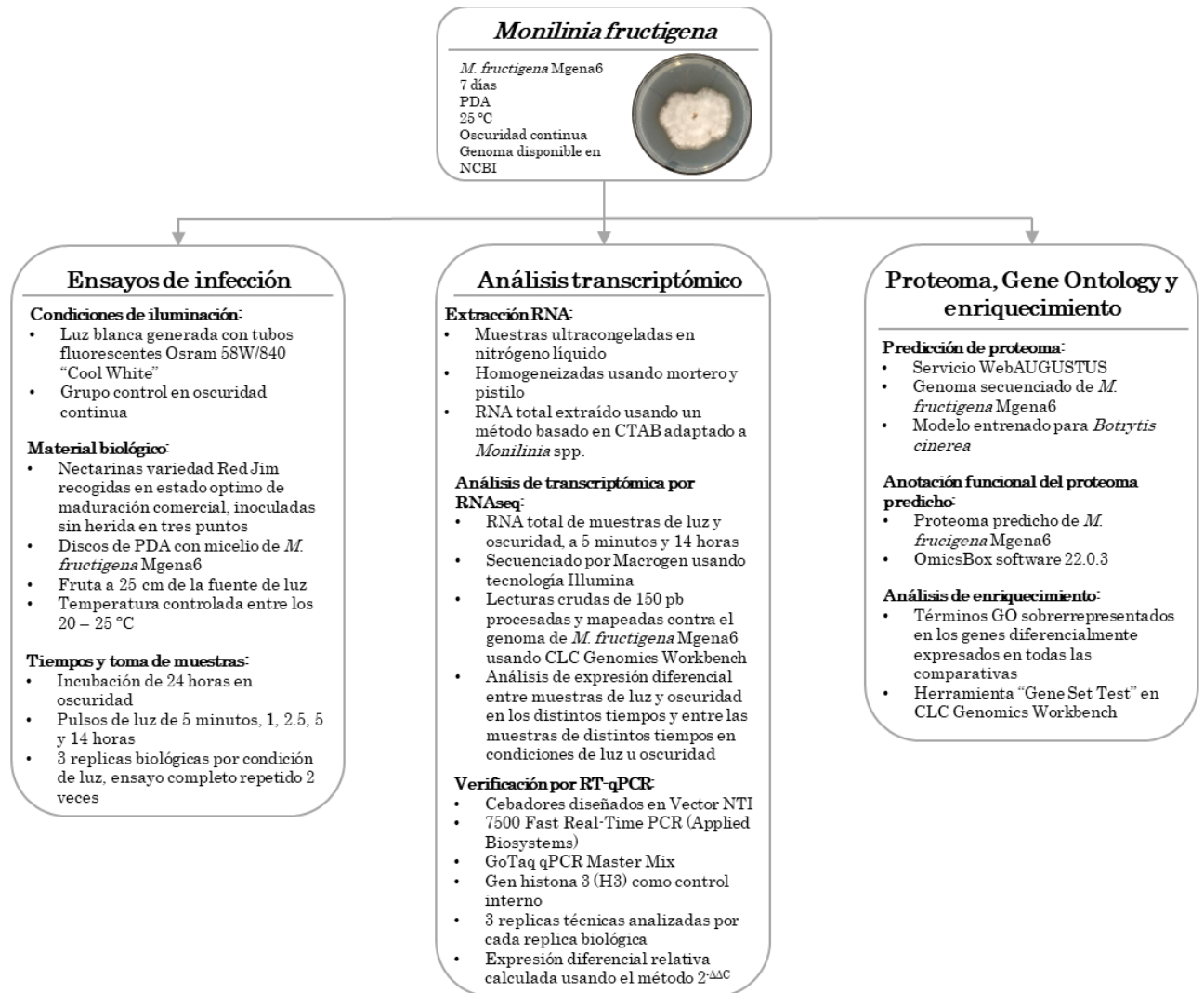


Figura 3.3. Representación esquemática de la metodología empleada para cumplir con el objetivo 3 presentado en esta tesis.

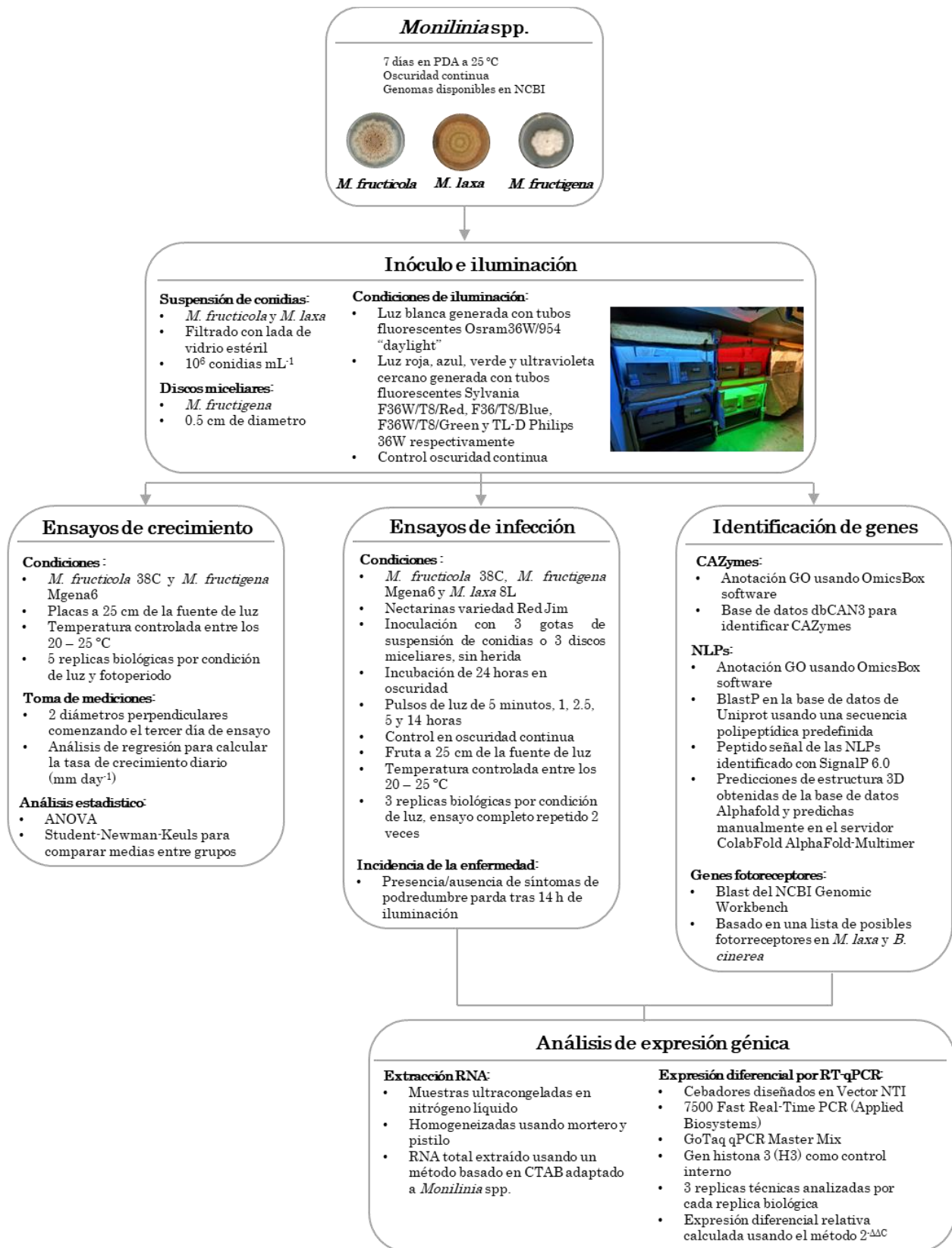


Figura 3.4. Representación esquemática de la metodología empleada para cumplir con el objetivo 4 presentado en esta tesis.

4. Resultados

4.1. Efecto de la luz sobre el desarrollo de la enfermedad y el crecimiento de la especie *Monilinia fructicola* y sus fotorreceptores.

4.1.1. Efecto de la luz en la tasa de crecimiento y esporulación de *M. fructicola*

Con el objetivo de evaluar el efecto de la luz blanca de espectro completo sobre el crecimiento y esporulación de *M. fructicola* 38C, se llevaron a cabo ensayos *in vitro* sobre medio de cultivo PDA y se calcularon tanto la tasa de crecimiento diario como los niveles de esporulación al final del experimento de *M. fructicola* 38C, usando el aislado 1C como control. Se observó que *M. fructicola* 38C creció más rápidamente que *M. fructicola* 1C en todas las condiciones probadas (Figura 4.1). Ambos aislados mostraron diferencias en el desarrollo de las colonias en respuesta a luz blanca de espectro completo. La velocidad de crecimiento de ambos aislados de *M. fructicola* se vio afectada por el fotoperiodo de 12 h de luz, mientras que el fotoperiodo de 8 h

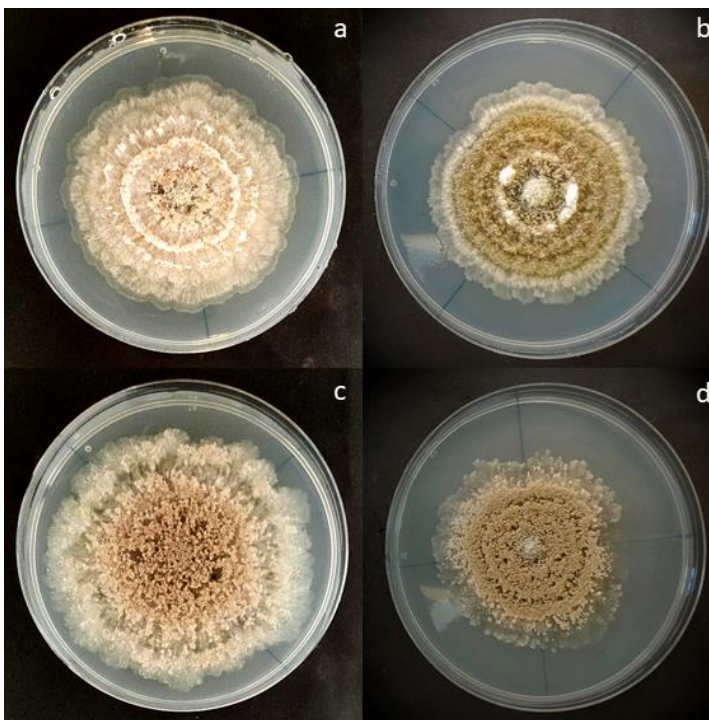


Figura 4.1. Efecto de la luz blanca sobre dos cepas de *M. fructicola* tras siete días de incubación. (a) *M. fructicola* 38C expuesta a un fotoperiodo de luz blanca de 12h; (b) *M. fructicola* 1C expuesta a un fotoperiodo de luz blanca de 12h; (c) *M. fructicola* 38C expuesta a oscuridad continua; (d) *M. fructicola* 1C expuesta a oscuridad continua.

de luz sólo afectó de forma significativa la velocidad de crecimiento *M. fructicola* 38C (Figura 4.2 A y B).

El efecto de la luz sobre la esporulación de ambos aislados fue diferente (Figura 4.2 C y D). La esporulación de *M. fructicola* 38C se redujo en los dos fotoperiodos estudiados, mostrando una mayor reducción en los niveles de producción de conidias bajo el fotoperiodo de 12 h de luz. Por el contrario, la luz no tuvo ningún efecto sobre la esporulación de *M. fructicola* 1C.

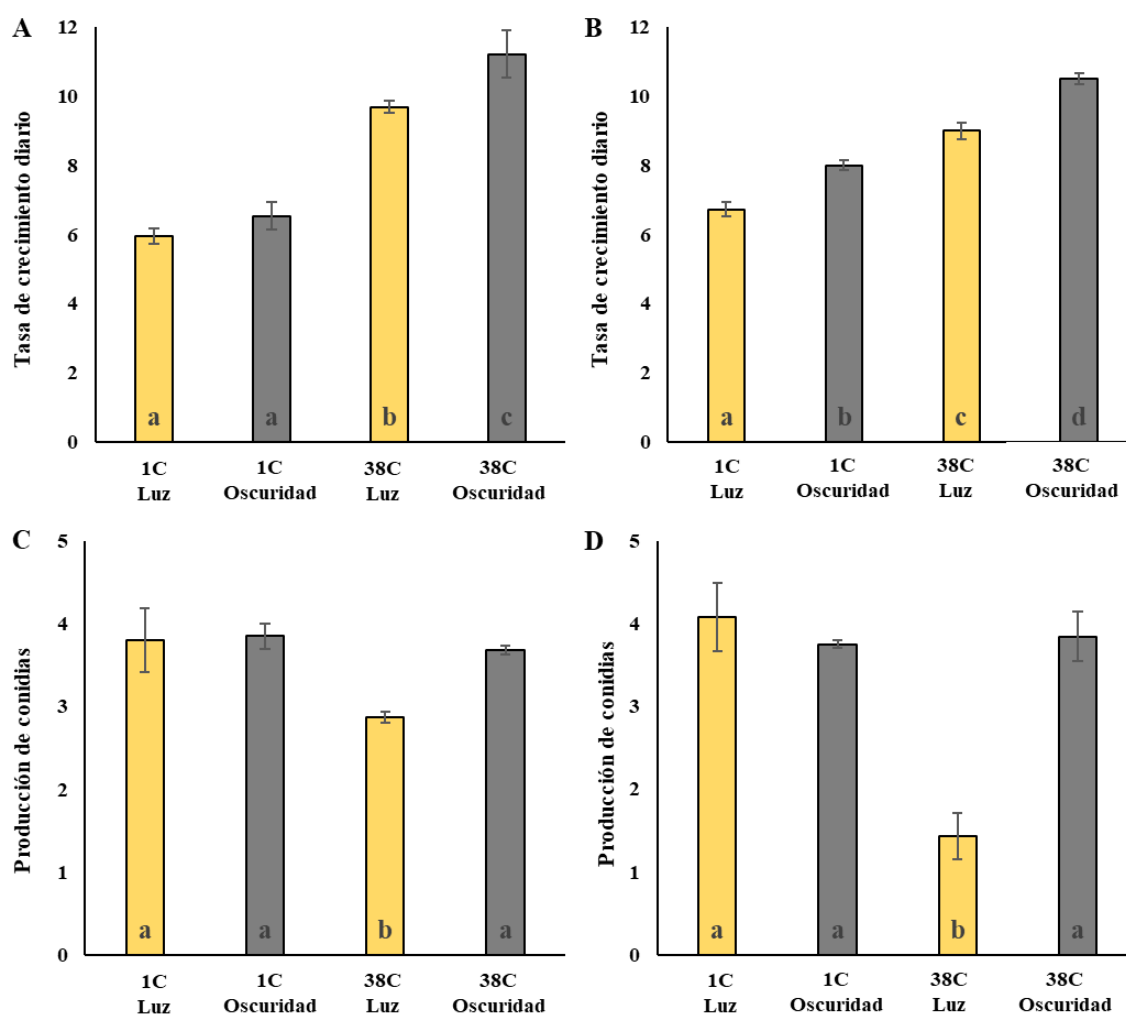


Figura 4.2. Efecto de dos fotoperiodos diferentes de luz blanca sobre la tasa de crecimiento micelial y la esporulación de dos cepas de *M. fructicola*, 38C y 1C, tras siete días de incubación. (A) tasa de crecimiento micelial bajo fotoperiodo de luz de 8h; (B) tasa de crecimiento micelial bajo fotoperiodo de luz de 12h; (C) esporulación bajo fotoperiodo de luz de 8h; (D) esporulación bajo fotoperiodo de luz de 12h. Los datos son la media y la desviación estándar de dos ensayos completos con cinco repeticiones cada uno. Las barras con la misma letra en cada gráfico no fueron significativamente diferentes según el test múltiple de Tukey.

4.1.2. Maquinaria de detección de luz en *M. fructicola* 38C.

Usando la secuencia genómica disponible para *M. fructicola* 38C y basándonos en el mecanismo fotorreceptor descrito previamente en *B. cinerea* y *M. laxa* (Schumacher, 2017; Rodríguez-Pires et al., 2021b), se identificaron en el genoma de *M. fructicola* 38C catorce genes que codifican proteínas potencialmente relacionadas con el proceso de detección de la luz y respuesta a la misma (listadas en la Tabla 4.1). Las secuencias aminoacídicas de dichas proteínas están bien conservadas y comparten un gran grado de similitud con las encontradas en *B. cinerea* y *M. laxa* (Tablas 4.1 y 4.2).

La arquitectura de dominios conservados en los fotorreceptores de *M. fructicola* 38C concuerda con estudios anteriores. Se encontraron tres fitocromos, fotorreceptores para luz roja que son sensibles a la proporción entre rojo/rojo lejano (*Mfcphy1*, *Mfcphy2* y *Mfcphy3*). Estas proteínas contienen un módulo PAS-GAF-PHY sensible a la luz, además de dominios que suelen encontrarse en las histidinas quinasa híbridas (HK). Para la detección de luz verde, *M. fructicola* 38C cuenta con dos fotorreceptores tipo opsinas, *Mfcop1* y *Mfcop2*. Las opsinas son bombas de protones accionadas por la luz verde integradas en la membrana celular unidas covalentemente a un residuo “*all-trans*” retinol cumpliendo la función de cromóforo. Para la detección de la luz azul existen muchas proteínas no relacionadas, comúnmente denominadas LOVs, con un dominio LOV (Light, Voltage, Oxygen) unido a un dinucleótido de flavina adenina (FAD/FMN). *M. fructicola* 38C tiene tres posibles fotorreceptores de dos grupos distintos de LOVs, a saber, L1, que son factores de transcripción de zinc de tipo GATA (*Mfcwcl1* y *Mfcwcl2*); y L2, un grupo de proteínas con un dominio LOV conservado, pero que carecen de cualquier dominio efector (*Mfcvvd1*). El último grupo de fotorreceptores encontrado en el proteoma predicho de *M. fructicola* 38C fueron 2 criptocromos, *Mfcry1* y *Mfcry2*. Estas proteínas son muy similares a las fotoliasas, pero han adquirido una función de señalización. Detectan la luz cercana al UV/azul con metiltetrahidrofolato (MTHF) como pigmento antena y FAD como cromóforo fotocatalítico, ambos unidos covalentemente a dominios de unión a PHR y FAD. Otro componente importante de la maquinaria de detección y señalización de la luz es la familia de proteínas *velvet*, que vincula el desarrollo y el metabolismo secundario con la luz. En *M. fructicola* se encontraron 4 proteínas pertenecientes

a esta familia: *Mfcvel1*, *Mfcvel2*, *Mfcvel3* y *Mfcvel4* (Figura 4.3). La Anotación Funcional GO confirma la posible función de estos genes (Tabla 4.2).

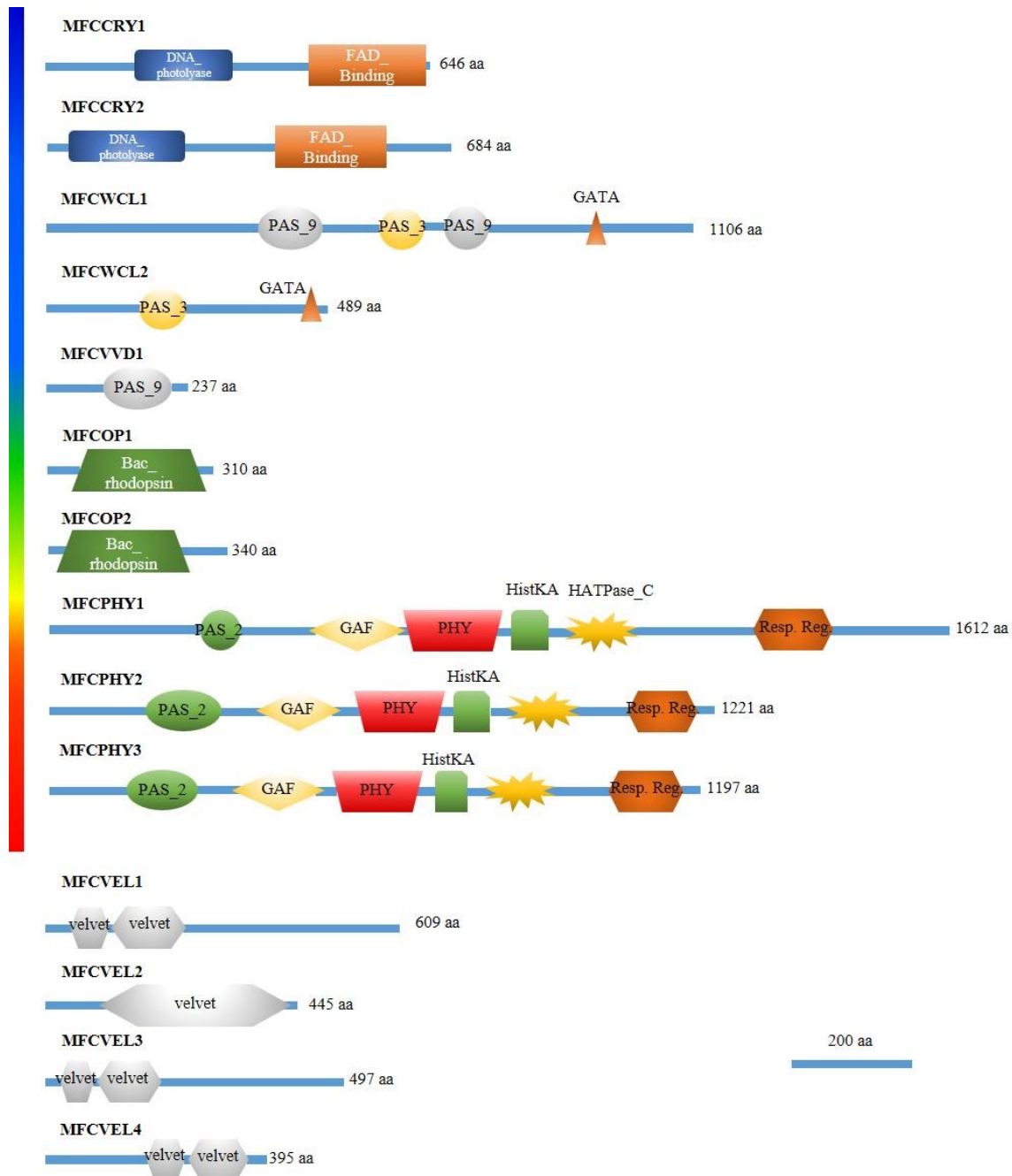


Figura 4.3. Arquitectura de los dominios predichos en fotorreceptores y proteínas de la familia velvet en *Monilinia fructicola* 38C. DNA_photolyase (PF00875), FAD_binding (PF03441), PAS_9 (PF13426), PAS_3 (PF08447), GATA (PF00320), Bac_rhodopsin (PF01036), PAS_2, (PF08446), GAF (PF01590), PHY (PF00360), HisKA (PF00512), HATPase_C (PF02518), Response_reg (PF00072), Velvet (PF11754).

Tabla 4.1. Proteínas relacionadas con la fotorrecepción en *M. fructicola* 38C y homología de sus dominios conservados en *B. cinerea* y *M. laxa*. ^aIdentificador único de proteína en el proteoma predicho de 38C. ^bFunción de proteína predicha basada en la anotación funcional. ^cLongitud de proteína predicha en el proteoma de 38C ^dIdentificador único de gen en el genoma de *M. laxa* 8L; identidad y cobertura BLASTP. ^eIdentificador único de gen en el genoma de *Botrytis cinerea* B05.10; cobertura BLASTP e identidad BLASTP.

Nombre gen	ID secuencia ^a	Función predica ^b	Longitud predicha ^c	<i>M. laxa</i> 8L ID ^d	% Identidad	% Covertur ^a	<i>B. cinerea</i> B05.10 Id ^e	% Identidad	% Covertura
Sensores de luz azul/ultravioleta cercano									
Mfcry1	MFRU_030g01000	putative deoxyribodipyrimidine photo-lyase	646	MICRY1	92.01	89.54	Bcry1	77.28	99.15
Mfcry2	MFRU_004g02180	DASH family cryptochrome protein	684	MICRY2	94.6	100	Bcry2	84.36	100
Sensores de luz azul									
Mfcwc1	MFRU_072g00010	putative white collar-1 protein	1106	MIWC1	96.26	99.91	Bewcl1	67.38	97
Mfcw2	MFRU_002g04340	putative white collar-2 protein	483	MIWC2	95.65	100	Bewcl2	72.27	99
Mfcvvd1	MFRU_006g01210	vivid PAS VVD protein	237	MIVVD1	94.09	100	Bevvd1	73.84	100
Sensores de luz verde									
Mfcop1	MFRU_001g04210	putative opsin-1 protein, translocase	310	MIOPS1	96.12	100	Bcpop1	87.5	100
Mfcop2	MFRU_009g00610	putative opsin-like protein, translocase	340	MIOPS2	89.12	100	Bcpop2	81.47	100
Sensores ratio rojo/rojo lejano									
Mfcphy1	MFRU_022g00870	PHY1, histidine kinase-group VIII protein	1612	MIPHY1	94.18	99.75	Bcphy1	77.91	99
Mfcphy2	MFRU_023g00600	PHY2, histidine kinase-group VIII protein	1221	MIPHY2	92.08	99.59	Bcphy2	75.69	100
Mfcphy3	MFRU_005g01680	PHY3, histidine kinase-group VIII protein	1197	MIPHY3	93.98	100	Bcphy3	76.11	97
Proteínas implicadas en la respuesta a luz									
Mfcvel1	MFRU_013g00210	velvet complex subunit 1	609	MIVEL1	94.39	100	Bevel1	72.76	96
Mfcvel2	MFRU_014g01690	velvet complex subunit 2	445	MIVEL2	95.74	94.61	Bevel2	86.92	94
Mfcvel3	MFRU_027g01050	velvet 3	497	MIVEL3	95.57	100	Bevel3	79.84	100
Mfcvel4	MFRU_018g00640	velvet 4	395	MIVEL4	95.16	98.4	Bevel4	87.11	95

Tabla 4.2. Anotación funcional y términos GO de genes relacionados con la fotorrecepción identificados en el proteoma predicho de *M. fructicola* 38C.

Gen	ID Proteína	GO ID	Términos GO	Nombre proteína
vvd1	MFRU_006g01210	C:GO:0005634	C:nucleus	putative vivid pas protein
cry1	MFRU_030g01000	P:GO:0000719; P:GO:0018298; F:GO:0016829; F:GO:0097159; F:GO:1901363	P:photoreactive repair; P:obsolete protein-chromophore linkage; F:lyase activity; F:organic cyclic compound binding; F:heterocyclic compound binding	Lyases
cry2	MFRU_004g02180	P:GO:0006281; P:GO:0018298; P:GO:0060258; P:GO:0075308; F:GO:0003913	P:DNA repair; P:obsolete protein-chromophore linkage; P:negative regulation of filamentous growth; P:negative regulation of conidium formation; F:DNA photolyase activity	Carbon-carbon lyases
phy1	MFRU_022g00870	P:GO:0000160; P:GO:0006355; P:GO:0009584; P:GO:0016310; P:GO:0018298; P:GO:1902531; F:GO:0000155; F:GO:0005524; F:GO:0009881; C:GO:0005737	P:phosphorelay signal transduction system; P:regulation of DNA-templated transcription; P:detection of visible light; P:phosphorylation; P:obsolete protein-chromophore linkage; P:regulation of intracellular signal transduction; F:phosphorelay sensor kinase activity; F:ATP binding; F:photoreceptor activity; C:cytoplasm	Transferring phosphorus-containing groups; Histidine kinase
phy2	MFRU_023g00600	P:GO:0000160; P:GO:0006355; P:GO:0009584; P:GO:0016310; P:GO:0018298; P:GO:1902531; F:GO:0000155; F:GO:0005524; F:GO:0009881; C:GO:0005737	P:phosphorelay signal transduction system; P:regulation of DNA-templated transcription; P:detection of visible light; P:phosphorylation; P:obsolete protein-chromophore linkage; P:regulation of intracellular signal transduction; F:phosphorelay sensor kinase activity; F:ATP binding; F:photoreceptor activity; C:cytoplasm	Transferring phosphorus-containing groups; Histidine kinase
phy3	MFRU_005g01680	P:GO:0000160; P:GO:0006355; P:GO:0009584; P:GO:0016310; P:GO:0018298; P:GO:1902531; F:GO:0000155; F:GO:0005524; F:GO:0009881; C:GO:0005737	P:phosphorelay signal transduction system; P:regulation of DNA-templated transcription; P:detection of visible light; P:phosphorylation; P:obsolete protein-chromophore linkage; P:regulation of intracellular signal transduction; F:phosphorelay sensor kinase activity; F:ATP binding; F:photoreceptor activity; C:cytoplasm	Transferring phosphorus-containing groups; Histidine kinase
op1	MFRU_001g04210	P:GO:0007602; P:GO:0018298; P:GO:0034220; F:GO:0005216; F:GO:0009881; C:GO:0016021	P:phototransduction; P:obsolete protein-chromophore linkage; P:ion transmembrane transport; F:ion channel activity; F:photoreceptor activity; C:integral component of membrane	Translocases
op2	MFRU_009g00610	P:GO:0007602; P:GO:0018298; P:GO:0034220; F:GO:0005216; F:GO:0009881; C:GO:0016021	P:phototransduction; P:obsolete protein-chromophore linkage; P:ion transmembrane transport; F:ion channel activity; F:photoreceptor activity; C:integral component of membrane	Translocases
wcl1	MFRU_072g00010	P:GO:0006355; F:GO:0008270; F:GO:0043565	P:regulation of DNA-templated transcription; F:zinc ion binding; F:sequence-specific DNA binding	putative white collar 1 protein
wcl2	MFRU_002g04340	P:GO:0006355; F:GO:0008270; F:GO:0043565; C:GO:0005634	P:regulation of DNA-templated transcription; F:zinc ion binding; F:sequence-specific DNA binding; C:nucleus	putative white collar-2 protein
vel1	MFRU_013g00210	P:GO:0030435; C:GO:0005634; C:GO:0005737; C:GO:0016021	P:sporulation resulting in formation of a cellular spore; C:nucleus; C:cytoplasm; C:integral component of membrane	Velvet 1
vel2	MFRU_014g01690	P:GO:0030435; C:GO:0005634; C:GO:0005737	P:sporulation resulting in formation of a cellular spore; C:nucleus; C:cytoplasm	putative developmental regulator protein
vel3	MFRU_027g01050	C:GO:0005634	C:nucleus	putative velvet 3 protein
vel4	MFRU_018g00640	C:GO:0005634	C:nucleus	putative vea protein

4.1.3. Perfiles transcripcionales en luz y oscuridad en *M. fructicola*.

Una vez identificada la batería de genes codificantes de posibles fotoreceptores pasamos a determinar si *M. fructicola* 38C podía sentir la luz midiendo o encontrando genes cuyos niveles de expresión estuviesen modificados por la

presencia o ausencia de luz. Para ello el efecto de la luz blanca sobre el perfil transcripcional de *M. fructicola* 38C se comprobó mediante técnicas de secuenciación masiva RNAseq usando ARN extraído de tejido de nectarinas infectadas con *M. fructicola* 38C. Tras un periodo de incubación en oscuridad de 24 h y 14 h de exposición a luz blanca de espectro completo, no se encontraron síntomas de enfermedad en ninguna muestra. Se realizó un análisis transcripcional comparativo entre muestras de tejido de fruta infectada por *M. fructicola* 38C tras 5 minutos y 14 h de irradiación con luz blanca y oscuridad continua. La mayoría de los transcritos que *M. fructicola* 38C expresó durante el proceso de infección, 6.309 a los 5 min de iluminación y 4.800 tras 14 h, no mostraron diferencias significativas en los niveles de expresión causadas por las condiciones de iluminación. Se encontró que un grupo significativo de genes, 3.612 a los 5 min de iluminación y 4.927 tras 14 h, que no eran expresados por el hongo (no detección de lecturas mapeadas). Sin embargo, se pudo determinar un conjunto de transcritos que cambiaron su perfil de expresión afectados por las condiciones de luz, 165 a los 5 min y 359 después de 14 h de iluminación (Tabla 4.3).

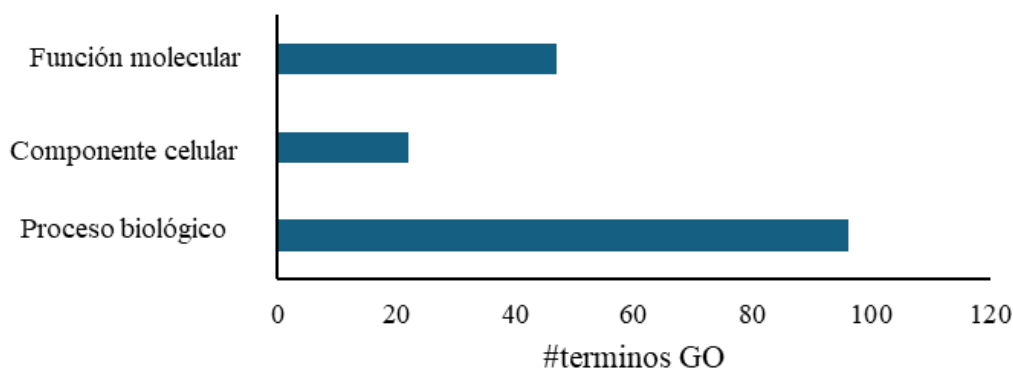
Entre los 165 genes de 38C que mostraron una expresión modificada tras 5 min de exposición a la luz blanca de espectro completo, 126 de ellos estaban regulados al alza, mientras que los 39 restantes estaban regulados a la baja. A las 14 h de iluminación, el número de transcritos regulados al alza era de 188, lo que suponía un aumento del 49,2%, y la cantidad también crecía hasta 171 para los genes reprimidos por luz, lo que significaba un aumento del 47,0%. Las muestras a los 5 min y a las 14 h de iluminación compartían 34 transcritos regulados al alza y 9 regulados a la baja (Tabla suplementaria 4.1). Las lecturas brutas correspondientes a este experimento de RNAseq están disponibles en el NCBI bajo el número de acceso PRJNA1011491.

Tabla 4.3. Resumen de los resultados del análisis RNAseq.

Analisis RNAseq	Nº transcritos inducidos	Nº transcritos reprimidos	Nº transcritos sin cambios	Nº transcritos sin expresión
5 minutos luz vs. oscuridad continua	126	39	6,309	3,612
14 h luz vs. oscuridad continua	188	171	4,800	4,927

Usando el paquete informático CLC Genome Workbench (Qiagen) realizamos un análisis de enriquecimiento en términos GO entre los DEGs en nuestros resultados de secuenciación de ARN para las categorías de proceso biológico, “componente de la pared celular” y “función molecular”. En total, encontramos 165 términos GO diferentes para la comparación de 5 min y 125 para la comparación de 14 h (figura 4.4). Los términos GO más sobrerrepresentados a los 5 min y a las 14 h tras la irradiación fueron “proceso metabólico peptídico” (14 hpi) y “proceso metabólico” (5 mpi) para la categoría de “proceso biológico,” parte citoplasmática” (14 hpi) y “parte de membrana” (5 mpi) para la categoría de “componente celular”, y “actividad oxidorreductasa” (14 hpi) y “actividad catalítica” (5 mpi) para la categoría de “función molecular”.

Luz vs. Oscuridad (5 minutos)



Luz vs. Oscuridad (5 minutos)

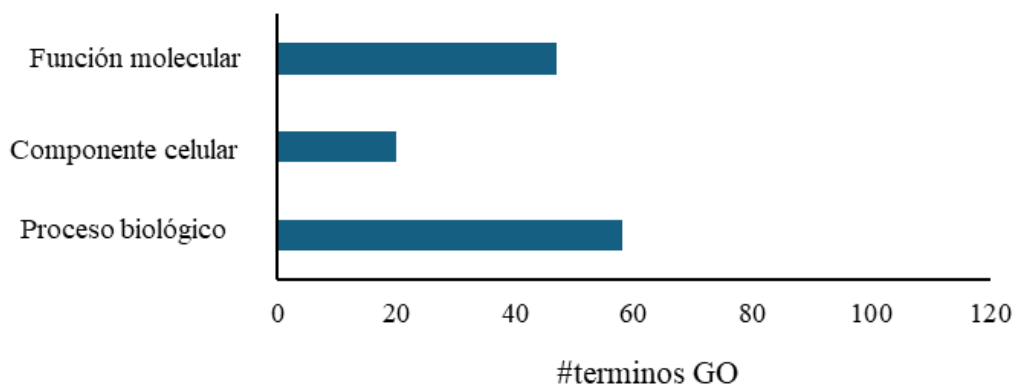


Figura 4.4. Distribución de términos GO por categoría en los DEG a los 5 minutos y a las 14 horas tras la irradiación con luz blanca de espectro completo.

Se puede observar un cambio en la actividad transcripcional en *M. fructicola* 38C debido a la exposición a la luz, basándonos en el número de DEGs y cuales genes se transcriben. Los términos GO “proceso metabólico de los carbohidratos”, “proceso catabólico de los polisacáridos”, “región extracelular” y la “actividad hidrolasa” también se encuentran enriquecidos entre los DEGs de *M. fructicola* 38C. Esto sugiere que la luz podría tener una función reguladora en la producción de enzimas activas de carbohidratos (CAZymes), algunas de las cuales están relacionadas con el proceso de degradación de la pared celular del hospedador actuando, por tanto, como factores de patogenicidad para *M. fructicola*.

4.1.4. Fotorregulación de genes fotorreceptores en *M. fructicola*.

Determinados los niveles de expresión en las diferentes condiciones, se prestó especial atención a los niveles de los genes codificantes de fotorreceptores. Entre los DEGs descritos en los análisis de expresión diferencial por RNAseq sólo uno de los genes codificantes de fotorreceptores estaba presente, *Mfcvvd1*. La expresión génica del resto de los fotorreceptores predichos no se vio afectados por la luz (Tabla 4.4), o mostraron valores de expresión muy bajos (medidos como transcritos por millón de kilobases, TPMs). Buscando transcritos regulados al alza que pudieran estar relacionados con la fotorrespuesta en *M. fructicola* 38C encontramos el gen MFRU_021g00620.1, denominado a partir de ahora *Mfcfar1*, que se encuentra significativamente regulado al alza en luz sobre oscuridad en ambos fotoperiodos (Tabla 4.4). La anotación funcional no asignó ninguna función ni términos GO a este gen.

Tabla 4.4. Valores de expresión medidos en TPMs para los genes posiblemente relacionados con la fotorrecepción en *M. fructicola* 38C.

Transcrito	5 minutos			14 h		
	TPM Luz	TPM Oscuridad	Log ₂ FoldChange	TPM Luz	TPM Oscuridad	Log ₂ FoldChange
MFCFAR1	657,9	34,1	4,3	534,4	38,2	3,6
MFCCRY1	90,5	40,2	1,2	48,4	22,8	0,9
MFCCRY2	197,5	109,6	0,9	32	26	-0,5
MFCWCL1	31,8	47,2	-0,5	24,4	21,7	0
MFCWCL2	64,4	41	0,7	35,6	11,9	1,4
MFCVVD1	346,4	27,2	3,7	105,93	35,1	1,4

MFCOP1	593,3	254,9	1,2	181,1	210,2	-0,4
MFCOP2	13,2	1,4	3,3	3,5	4,5	0,2
MFCPHY1	25,2	33,4	-0,4	11,1	15,6	1,2
MFCPHY2	66,6	28,1	1,3	33,2	11,6	1,3
MFCPHY3	0,7	0,2	1,5	0	0,5	-3,3
MFCVEL1	99,9	141,7	-0,5	46,5	57,2	-0,5
MFCVEL2	118,7	93,5	0,4	78,6	28,8	1,3
MFCVEL3	4	5,1	-0,4	1,2	0	3
MFCVEL4	20,3	23,6	-0,2	11,6	17	-0,7

4.1.5. *far1*, un pequeño gen codificador de proteínas regulado al alza durante la exposición a la luz.

Far1 es una proteína de 82aa con función indefinida, que carece de dominios conservados conocidos o términos GO asociados. Se han encontrado genes homólogos a *Mcfar1* en el genoma de hongos cercanos a *Monilinia* spp. La herramienta BlastP en UniProt (Bateman et al., 2023) devolvió 250 coincidencias, de las cuales 248 pertenecían al filo *Ascomycota*, todas ellas pertenecientes a la subdivisión *Pezizomycotina*, con coincidencias en seis de doce clases dentro de este clado. Las clases más abundantes fueron *Eurotiomycetes*, con 91 resultados, incluidos los géneros *Aspergillus* y *Penicilium* spp; *Sordariomycetes*, con 70 resultados, incluidos géneros como *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Verticillium*, *Neurospora*, *Magnaporthe* y *Rosellinia* spp; y *Leotiomycetes*, con 58 resultados, incluidos géneros como *Botrytis*, *Monilinia* y *Sclerotinia* spp. Así pues, Far1 es una proteína ampliamente distribuida en el filo *Ascomycota*, presente en algunas especies importantes de hongos fitopatógenos y en organismos modelo bien estudiados (Figura 4.5).

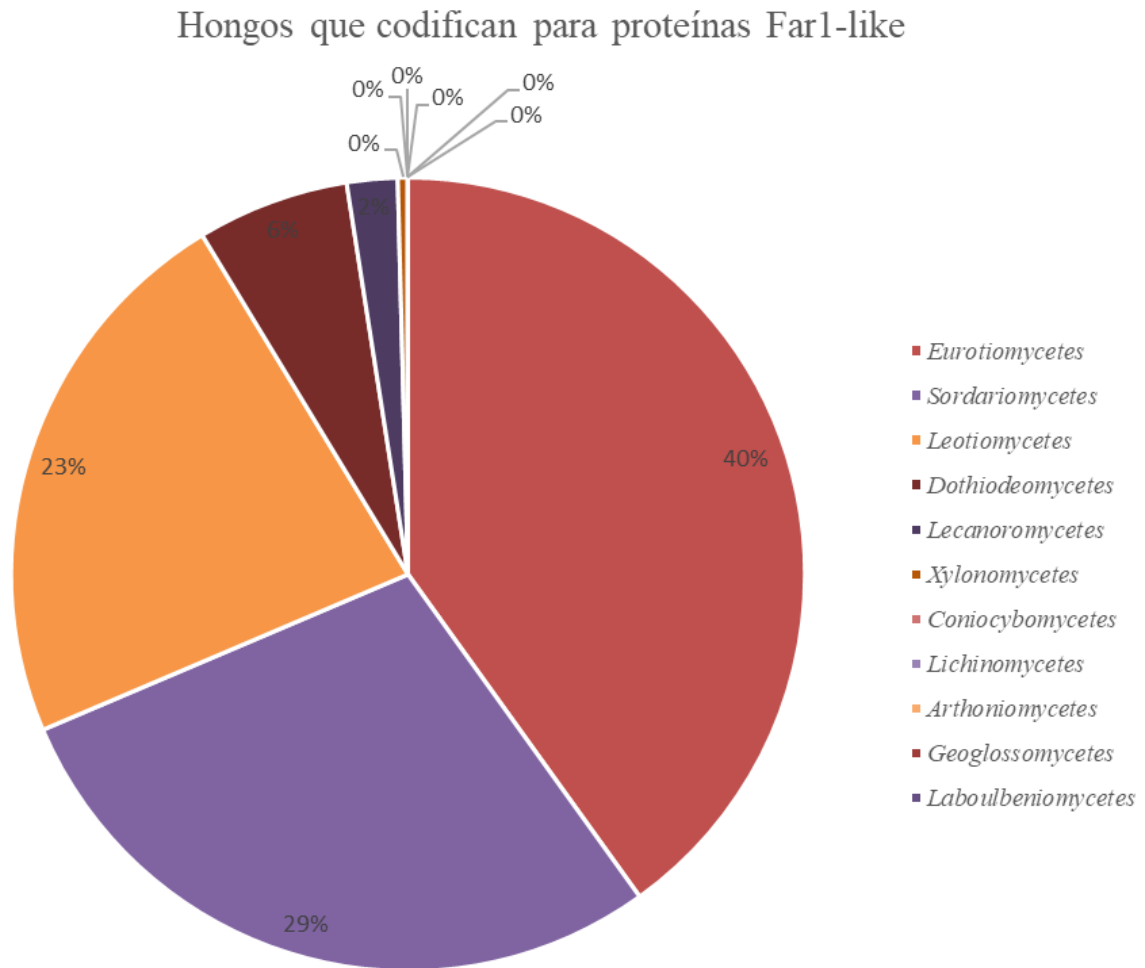


Figura 4.5. Abundancia relativa de especies que codifican para una protenina similar a Far1 en la clase *Pezizomycotina*.

Al reconstruir las relaciones evolutivas utilizando la secuencia aminoacídica de la proteína, encontramos que todas las secuencias de *Monilinia spp.* formaban un clado juntas, con *Sclerotinia spp.* y *Botrytis spp.* como parientes cercanos. El resto de clados del árbol son mucho más inciertos, lo que sugiere funciones conservadas en aquellos ortólogos pertenecientes a la clase *Leotiomycetes* (Figura 4.6).

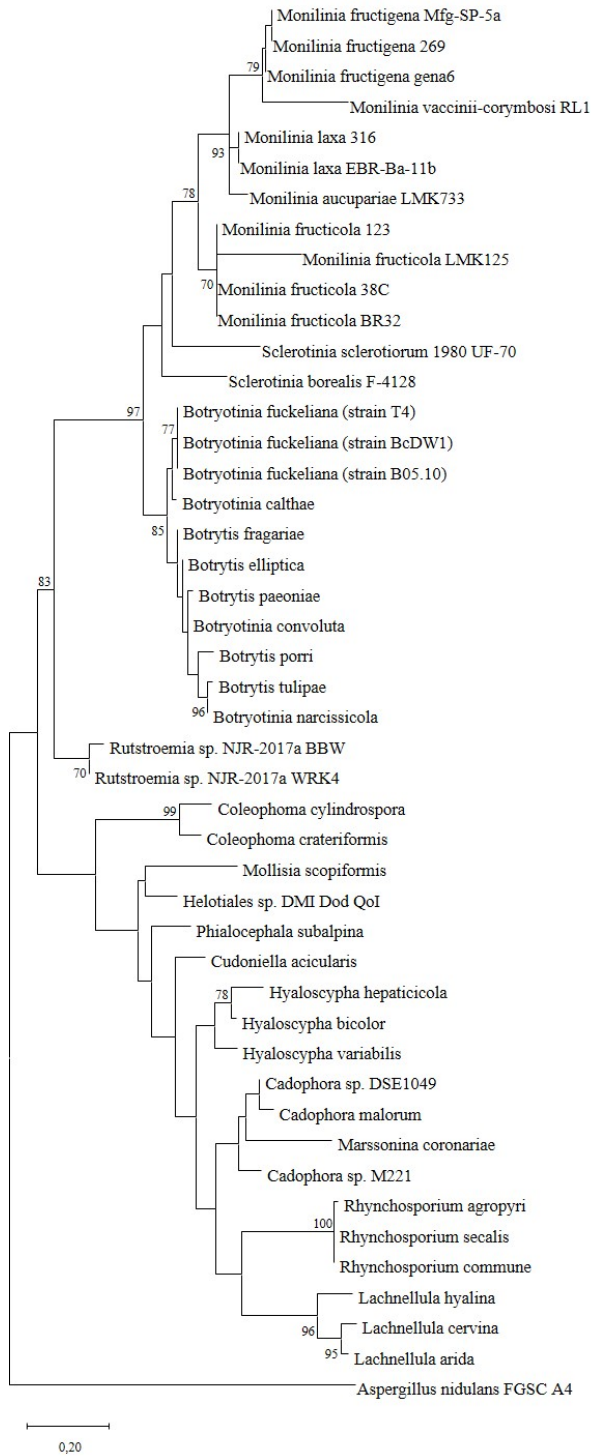


Figura 4.6 Análisis evolutivo de los ortólogos de *far1* mediante el método de Máxima Verosimilitud. Se muestra el árbol con la mayor verosimilitud logarítmica (-2766,09). Junto a las ramas se muestra el porcentaje de árboles en los que los taxones asociados se agruparon. El árbol está dibujado a escala, con longitudes de rama medidas en número de sustituciones por sitio. Este análisis incluyó 46 secuencias de aminoácidos. En el conjunto de datos final había un total de 221 posiciones. Los análisis evolutivos se realizaron usando MEGA X (Kumar et al., 2018)

4.1.6. Análisis de expresión diferencial mediante RT-qPCR en *M. fructicola*.

De entre los genes cuyas proteínas potencialmente relacionadas con la respuesta a luz en *M. fructicola*, sólo *far1* y *vvd1* se expresaron diferencialmente bajo luz en nuestro análisis transcriptómico. Estos resultados fueron confirmados mediante RT-qPCR utilizando las mismas muestras de tejido vegetal infectado por *M. fructicola* 38C que fueron objeto del análisis RNAseq, además de muestras en tiempos intermedios, de 1, 2,5 y 5 h. Los genes *vvd1* y *far1* mostraron una regulación al alza estadísticamente significativa cuando se expusieron a la luz blanca. *vvd1* aumentó en gran medida sus niveles de expresión tras un breve pulso de luz de 5 min, disminuyendo con el tiempo, pero siendo aun significativamente diferente a la oscuridad continua, y volviendo a aumentar en la marca temporal de las 14 h. Los niveles de expresión de *far1* se incrementaron

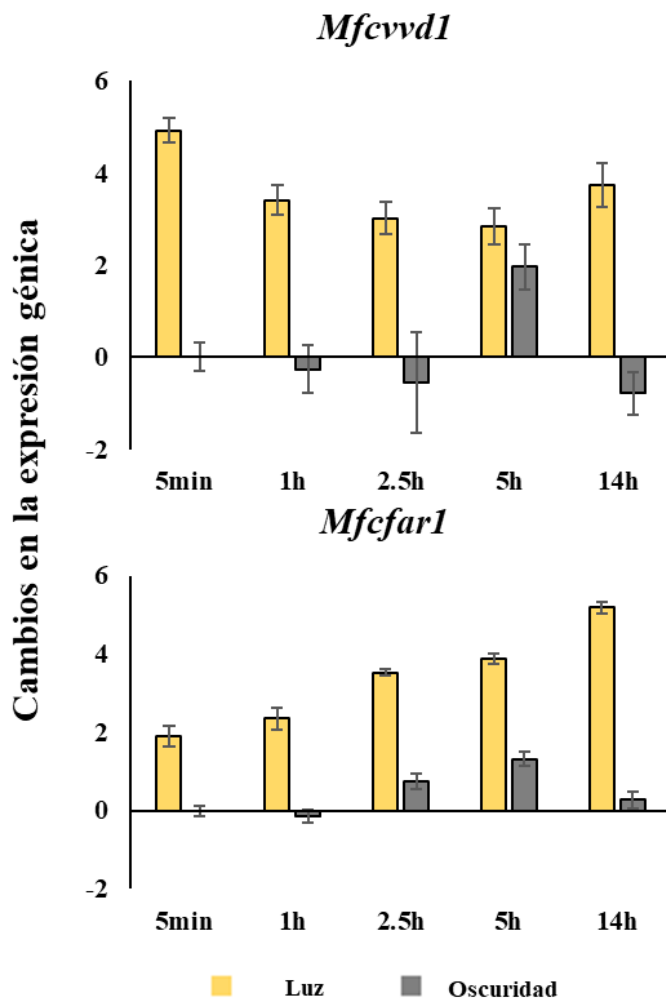


Figura 4.7. Cambios en la expresión génica relativa de *Mfcvvd1* y *Mfcfar1* tras la exposición a la luz diurna y a la oscuridad continua de *M. fructicola* 38C cuando crece en tejido de fruta. La escala es $\text{Log}_2 2^{-\Delta\Delta C_t}$ de los valores medios del Fold Change, incluyendo la desviación estándar, de tres réplicas biológicas, con tres réplicas técnicas cada una, después de la normalización contra 0h post iluminación usando el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Schmittgen & Livak, 2008), con histona H3 como gen control endógeno.

tras la exposición a la luz, alcanzando su punto máximo a las 14 h post irradiación cuando *M. fructicola* 38C crece infectando al huésped (Figura 4.7).

También nos preguntamos si la presencia del huésped modificaría el efecto de la exposición a la luz sobre los niveles de expresión de los fotorreceptores. Para comprobar esta hipótesis, se realizaron RT-qPCR de 8 de los posibles genes codificantes para fotorreceptores. Sólo 5 de estos genes y el gen de función desconocida *Mfcfar1* aumentaron significativamente sus niveles de expresión durante el tiempo que *M. fructicola* 38C estuvo expuesta a la luz al crecer en PDB (Figura 4.8). El gen *Mfcvvd1*, sensible a la luz azul, fue el que experimentó una up-regulación más alta, multiplicando por seis sus niveles de expresión a una hora de la irradiación y manteniéndolos durante todo el experimento. Los genes que codifican los fotorreceptores para luz UV/azul *cry1* y *cry2* mostraron el mismo patrón, aumentando continuamente sus niveles de expresión, pero sin alcanzar nunca los niveles de fotoinducción de *Mfcvvd1*. *Mfcphy2*, que codifica un fotorreceptor de luz roja, comparte el mismo perfil de expresión que *cry1* y *cry2*, pero con un cambio general menor. Por el contrario, el fotorreceptor de luz verde

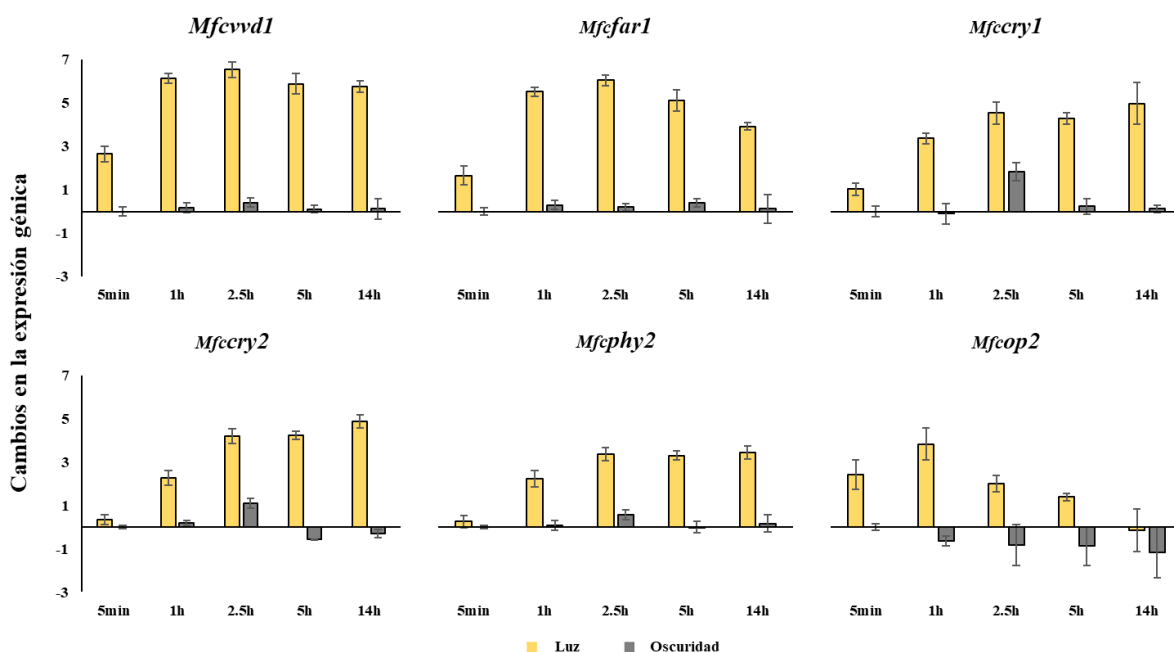


Figura 4.8. Cambios en la expresión génica relativa de *Mfcvvd1*, *Mfcfar1*, *Mfcry1*, *Mfcry2*, *Mfcphy2* y *Mfcop2* tras la exposición a la luz diurna y a la oscuridad continua de *M. fructicola* 38C cuando crece sobre PDB. La escala es $\text{Log}_2 2^{-\Delta\Delta C_t}$ de los valores medios del Fold Change, incluyendo la desviación estándar, de tres réplicas biológicas, con tres réplicas técnicas cada una, después de la normalización contra 0h post iluminación usando el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Schmittgen & Livak, 2008), con histona H3 como gen control endógeno.

op2 activa su expresión a los cinco minutos de exposición a la luz y alcanza su máximo a 1 h de la iluminación, para luego disminuir sus niveles de expresión hasta no ser significativamente diferente de aquellos del control en oscuridad continua (Figura 4.8).

4.2. Efecto de la luz roja sobre la podredumbre parda causada por *Monilinia fructicola* e identificación de genes relacionados con la patogenicidad: la familia CAZyme y las toxinas formadoras de poros.

4.2.1. Las luces roja y azul modifican el crecimiento micelial y la formación de conidias sobre PDA

M. fructicola 38C se sometió a la evaluación de su velocidad de crecimiento y capacidad de esporulación en medio de cultivo bajo diferentes fotoperiodos de luz fluorescente roja y azul, utilizando la oscuridad continua como grupo de control. Las tasas de crecimiento y la esporulación de *M. fructicola* 38C se vieron significativamente influidas por la luz fluorescente roja y azul en comparación con la oscuridad continua en las condiciones de nuestro estudio (figura 4.9). La luz roja siempre produjo una severa reducción en la formación de conidias (figura 4.10A y C) mientras que sólo aumentó la tasa de crecimiento de *M. fructicola* 38C en el fotoperiodo con 12 h de exposición a la luz (figura 4.10B). La luz azul tuvo un efecto totalmente diferente sobre la tasa de crecimiento y la esporulación, reduciendo la producción de conidias en el fotoperiodo con más horas de exposición a la luz (figura

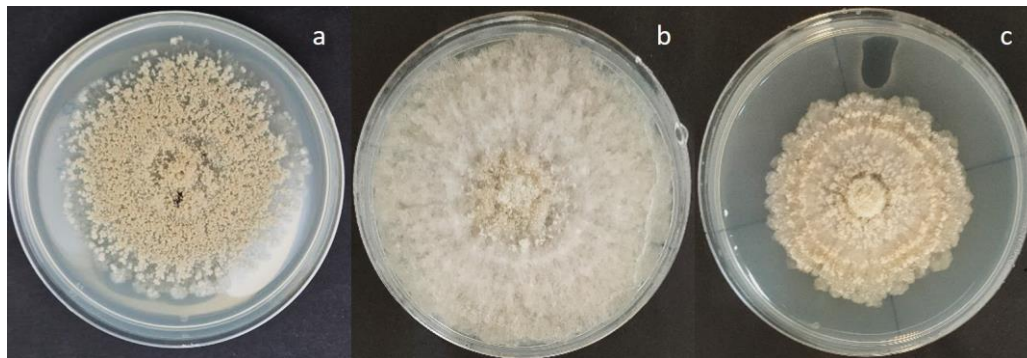


Figura 4.9. Crecimiento colonial de *M. fructicola* 38C tras siete días de cultivo en (a) oscuridad continua, (b) fotoperiodo de 12 h de luz roja/ 12 h de oscuridad y (c) fotoperiodo de 12 h de luz azul/ 12 h de oscuridad.

4.10A), pero induciendo siempre una reducción de la tasa de crecimiento (figura 4.10B y D).

El fotoperiodo de 12 h de luz/12 h de oscuridad tuvo mayores efectos sobre la esporulación que el de 8 h de luz/16 h de oscuridad. La luz roja produjo una reducción significativa de la formación de conidias en *M. fructicola* 38C en el fotoperiodo de 8 h luz/16 h oscuridad, mientras que la luz azul no causó efectos significativos. Por el contrario, la luz azul causó una disminución muy significativa en la tasa de formación de conidias en el fotoperiodo de 12 h de luz/12 h de oscuridad, mientras que la luz roja inhibió completamente la esporulación (figura 4.10C y D).

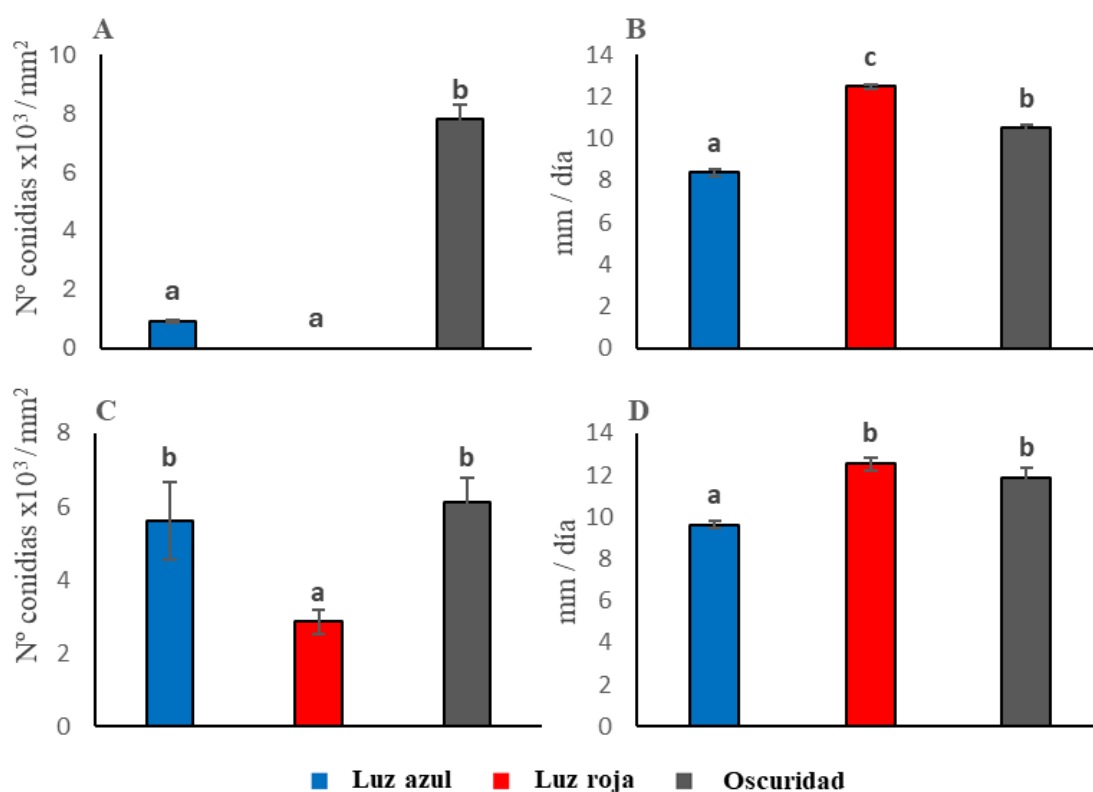


Figura 4.10. Efecto de dos fotoperiodos diferentes de luz roja y azul sobre la tasa de crecimiento del micelio y la esporulación de *M. fructicola* 38C sobre PDA tras siete días de incubación. (A) producción de conidias de *M. fructicola* 38C bajo luz roja y azul en un fotoperiodo de 12 h de luz/12 h de oscuridad; (B) tasa de crecimiento de *M. fructicola* 38C bajo luz roja y azul en un fotoperiodo de 12 h de luz/12 h de oscuridad; (C) producción de conidias de *M. fructicola* 38C bajo luz roja y azul en un fotoperiodo de 8 h de luz/16 h de oscuridad; (D) tasa de crecimiento de *M. fructicola* 38C bajo luz roja y azul en un fotoperiodo de 8 h de luz/16 h de oscuridad. Los datos se representan como la media y el error estándar de dos experimentos. Las barras con la misma letra en cada gráfico no fueron significativamente diferentes mediante la prueba de rango múltiple de Tukey.

4.2.2. La luz roja y azul aumentan la velocidad de desarrollo de la enfermedad en nectarinas

Para analizar la influencia de la luz roja y azul sobre las primeras fases de desarrollo de la enfermedad y el proceso de infección, las nectarinas inoculadas se incubaron bajo luz fluorescente roja y azul, y un grupo de control se mantuvo en oscuridad total. Como era de esperar, no se observaron síntomas de la enfermedad en el grupo de control, que normalmente tiene un periodo de incubación de dos a tres días antes de que aparezcan los síntomas de la infección temprana. Se observó que, en comparación con la oscuridad continua, tanto la luz roja como la azul aceleraban la aparición de los síntomas de la enfermedad de la podredumbre parda en las nectarinas (figura 4.11A, B y C). Después de 24 h de incubación en oscuridad más 14 horas de iluminación, la maceración del tejido era visible en el 50% y el 66,67% de los puntos de inoculación bajo luz azul y roja, respectivamente (figura 4.11D). No se detectó maceración tisular ni ningún otro síntoma de la enfermedad bajo luz azul o roja antes de las 14 horas de iluminación.

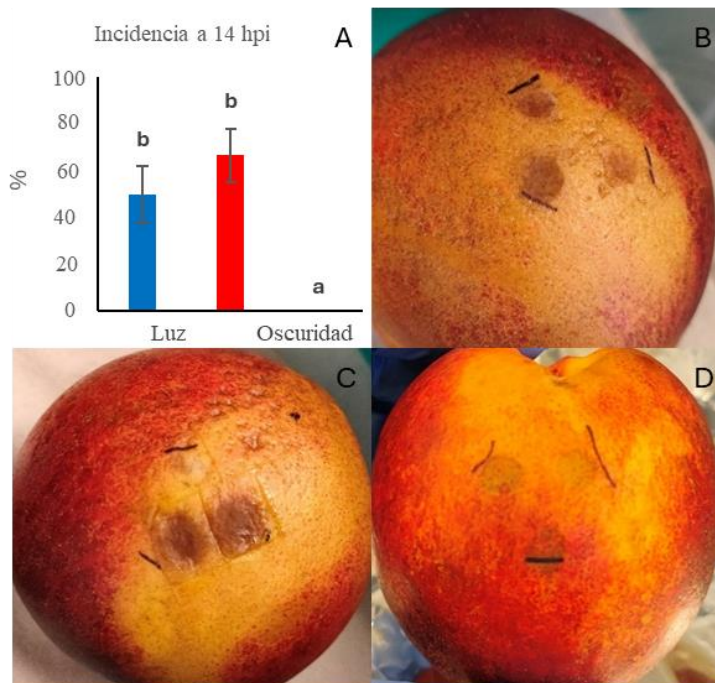


Figura 4.11. Test de medida de la incidencia de la enfermedad en diferentes condiciones de iluminación. (A) Incidencia de la podredumbre parda a las 14 h post-iluminación para cada luz. Los datos se representan como la media y el error estándar de dos experimentos con tres frutos por tratamiento cada uno. Efecto de (B) la luz roja, (C) la luz azul y (D) la oscuridad en las primeras fases de desarrollo de la enfermedad por *M. fructicola* 38C de. El período de incubación fue de 38 h, con 24 h a 22 °C en la oscuridad y 14 h de iluminación ininterrumpida en (B) y (C).

4.2.3. Impacto de la luz roja y azul en la regulación de los genes implicados en el proceso de degradación de la pared celular en la fruta y en el medio sintético

Como se ha descrito anteriormente, la luz roja y azul tenían un impacto en la velocidad de desarrollo de la enfermedad en las primeras fases de infección y colonización de la fruta. Estos resultados apuntaban a diferencias inducidas por la luz en el patrón de regulación de los genes implicados en el proceso de degradación de la pared celular. Para probar esta hipótesis, se midió la expresión génica mediante RT-qPCR en ARN extraído de muestras de *M. fructicola* 38C cultivadas sobre medios de cultivo sintético PDB y 1% *nectarine*, así como de tejido de *nectarina* infectado, bajo estímulos de luces roja y azul de duración ascendente.

Como prueba inicial, determinamos si existe un control transcripcional dependiente de la luz azul y roja en *M. fructicola* 38C. Para ello se estudiaron los genes *Mfcvvd1* y *Mfcfar1*. La Figura 4.12 muestra que ambos genes mostraron un aumento significativo en sus niveles de expresión génica por la luz azul en PDB en comparación con el grupo de control. *Mfcfar1* también fue inducido por la luz azul en el medio 1% *nectarine* y, por el contrario, significativamente reprimido por la

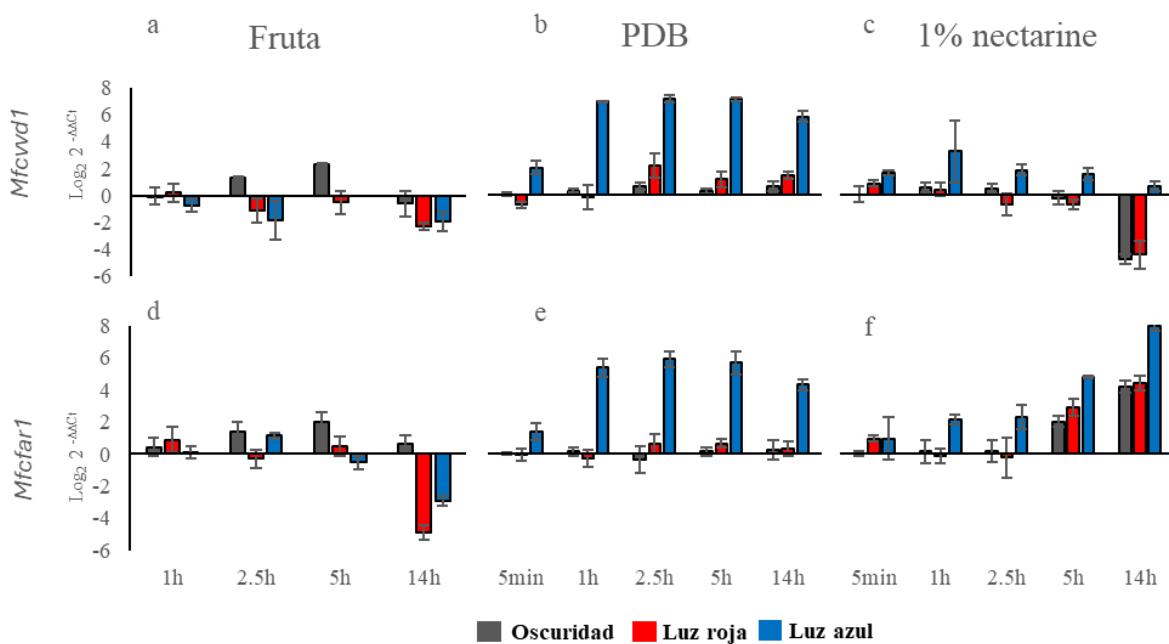


Figura 4.12. Cambios en la expresión génica relativa de dos genes relacionados con la fotorrecepción *vvd1* en (a) fruto, (b) PDB y (c) 1% *nectarine* y *far1* en (d) fruto, (e) PDB y (f) 1% *nectarine*. La escala es $\text{Log}_2 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ de los valores medios *Fold Change*, incluido el error estándar, de tres experimentos separados utilizando el método $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ (Schmittgen y Livak, 2008), con la histona H3 como gen de control endógeno.

luz roja y azul a las 14 h post-iluminación sobre la superficie de la nectarina. Estos resultados sugirieron que *M. fructicola* 38C es capaz de responder a la estimulación lumínica en todos los medios de cultivo, además de que el medio en el que se encuentra el hongo juega un papel importante en la regulación de la expresión génica del hongo.

Una vez determinado que *M. fructicola* 38C responde al estímulo luz en todos los medios de cultivo ensayados, ampliamos nuestro estudio para medir los efectos de las luces roja y azul sobre los niveles de expresión de nuestro grupo seleccionado de CWDEs. Ambas luces modifican significativamente los niveles de expresión de los ocho genes estudiados frente a las condiciones de oscuridad (Figuras 4.13 a 4.15). Además, el medio de cultivo también tuvo un gran impacto en la expresión

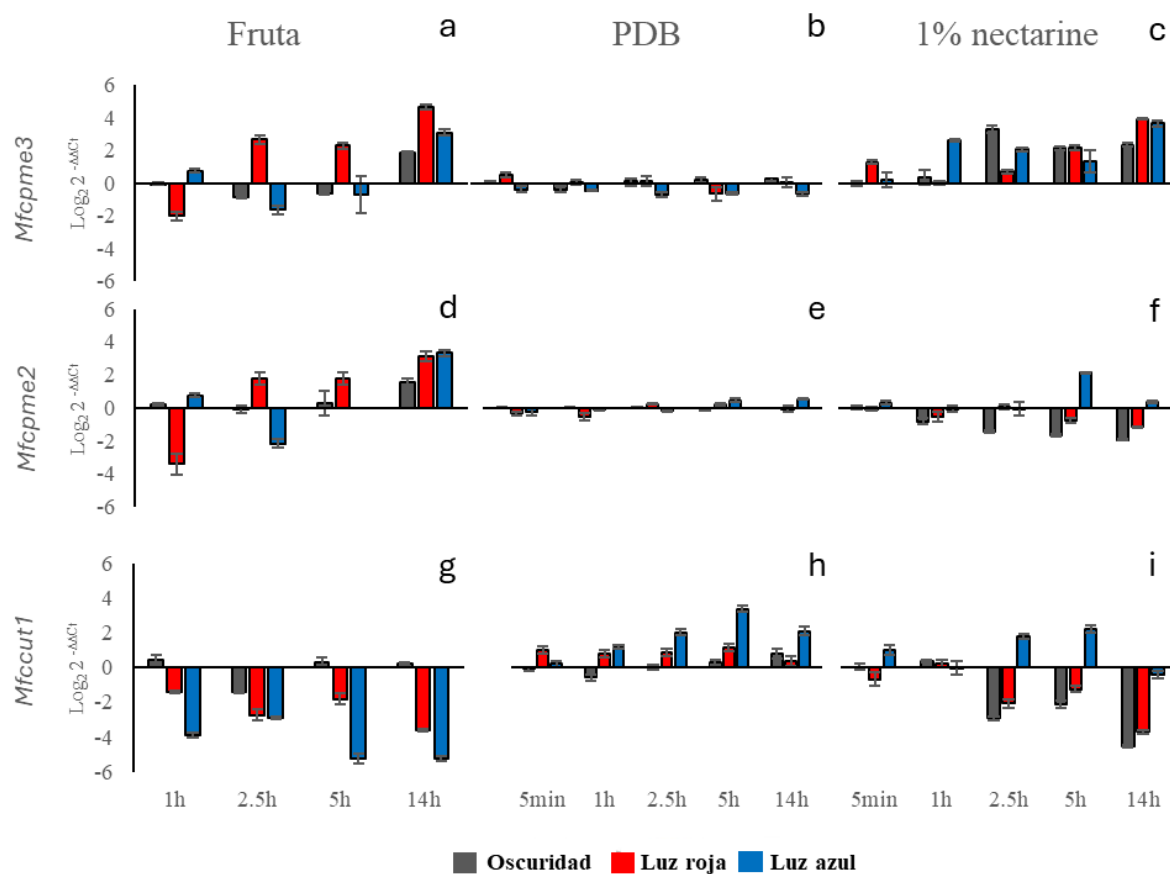


Figura 4.13. Cambios en la expresión génica relativa de tres genes codificantes para CAZymes en (a, d y g) fruto, (b, e y h) PDB y (c, f y i) 1% nectarine; La escala es $\text{Log}_2 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ de los valores medios del *Fold Change*, incluido el error estándar, de tres experimentos separados utilizando el método $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ (Schmittgen y Livak, 2008), con la histona H3 como gen de control endógeno.

de estos genes, ya que las luces roja y azul indujeron la transcripción de genes distintos, dependiendo de si *M. fructicola* 38C crece en fruta, PDB o 1% nectarine.

En particular, la luz roja y azul indujo la expresión del gen *Mfcpme3*, codificante de la carbohidrato esterasa, en la fruta y en 1% *nectarine* a las 14 h post-iluminación (figura 4.13a y c), mientras que *pme2* fue principalmente fotoinducido en muestras procedentes de fruta (figura 4.13d). Además, el gen *Mfcut1* fue, inesperadamente, fuertemente reprimido por ambas luces en muestras procedentes de fruta y 1% *nectarine*, pero fue fotoinducido por luz azul en muestras crecidas sobre PDB y 1% *nectarine* (figura 4.13g, h e i).

Los niveles de expresión de los genes que codifican para la poligalacturonasa *Mfcpg1* y celulasa *Mfcell1* mostraron una baja fotoinducción por luces rojas en los frutos, apenas alcanzando significación estadística (figura 4.14a y d). También encontramos una diferencia significativa en la expresión de *Mfcpg1* por luz roja cuando *M. fructicola* 38C creció infectando nectarina (figura 4.14a) y a las 5 h bajo luz azul en comparación con el grupo control en 1% *nectarine* (figura 4.14c). Además, la expresión de *Mfcell1* mostró una fotoactivación significativa por luz azul a 1 y 14 hpi en nectarina al 1%, y por luz roja sólo a los 5 min post irradiación (figura 4.14d y f).

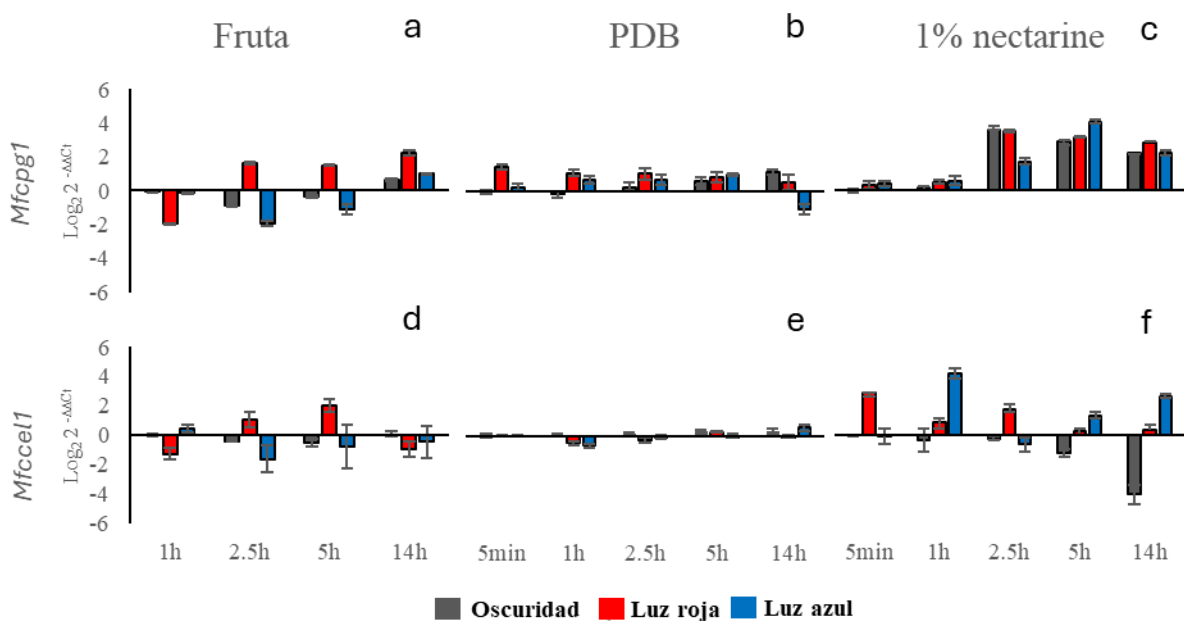


Figura 4.14. Cambios en la expresión génica relativa de dos genes codificantes para CAZymes en (a, d y g) fruto, (b, e y h) PDB y (c, f y i) 1% nectarine. Los datos están representados como el $\text{Log}_2 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ de los valores medios del Fold Change, incluido el error estándar, de tres experimentos separados utilizando el método $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ (Schmittgen y Livak, 2008), con la histona H3 como gen de control endógeno.

Los niveles de expresión de las PLs *Mfcpn11* y *Mfcpn12* también experimentaron fotoinducción por luz roja y azul con diferencias en función del medio de cultivo usado para obtención de micelio (figura 4.15). Estas PLs fueron las CAZymes elegidas por *M. fructicola* 38C cuando el hongo creció en medio 1% nectarine y fueron fuertemente fotoinducidas por luz roja y azul (figura 4.15c y f). El de las luces roja y azul en la expresión génica de estas PLs en el fruto fue diferente, y sólo *Mfcpn11* bajo luz roja y *Mfcpn12* bajo luz azul a las 5 h post-iluminación mostraron una regulación al alza estadísticamente significativa, mientras que la luz azul indujo una fuerte represión de *Mfcpn11* (figura 4.15a y d).

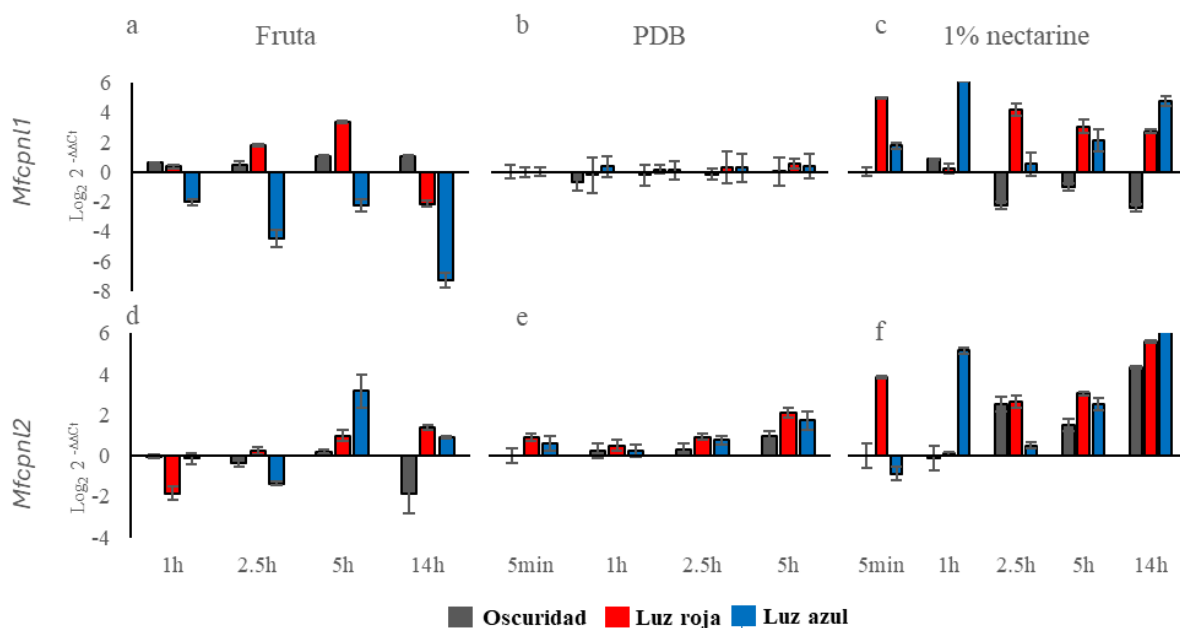


Figura 4.15. Cambios en la expresión génica relativa de los genes *Mfcpn11* y *Mfcpn12* en (a, d y g) fruto, (b, e y h) PDB y (c, f y i) 1% nectarine. Los datos están representados como el $\text{Log}_2 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ de los valores medios del Fold Change, incluido el error estándar, de tres experimentos separados utilizando el método $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ (Schmittgen y Livak, 2008), con la histona H3 como gen de control endógeno.

4.2.4. La luz roja y azul inducen la expresión de la proteína NEP1-like NEP2 durante las primeras etapas de la infección

Usando el mismo enfoque experimental que en el apartado 4.2.3, se comprobó el efecto de las luces roja y azul en la expresión del gen *Mfcnep2* cuando *M. fructicola* 38C crece sobre diferentes medios de cultivo. El gen *Mfcnep2* fue fuertemente fotoinducido por la luz roja desde tiempos de exposición muy tempranos cuando *M.*

fructicola 38C creció sobre la superficie del fruto. Los valores $\text{Log}_2 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ oscilaron entre 4,8 y 5,5 a las 2,5, 5 y 14 h post-iluminación (figura 4.16a). La luz azul también indujo la expresión del gen *Mfcnep2*, aunque de una forma más suave, ya que sólo comenzó a las 5 h post-iluminación y alcanzó un valor $\text{Log}_2 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ máximo de 4,6 a las 14 h post-iluminación (figura 4.16a). Los niveles de expresión de *Mfcnep2* también aumentaron en el grupo de control, y tras un total de 38 h de incubación en oscuridad, encontramos un aumento estadísticamente significativo en la actividad transcripcional de este gen (figura 4.16a). Las luces rojas y azules no causaban diferencias estadísticamente significativas en la expresión del gen *Mfcnep2* cuando se comparaban con el grupo de control en PDB o 1% *nectarine* (figura 4.16b y c), lo que significa que el cultivo de medios desempeña un papel importante en la regulación génica de esta NLP.

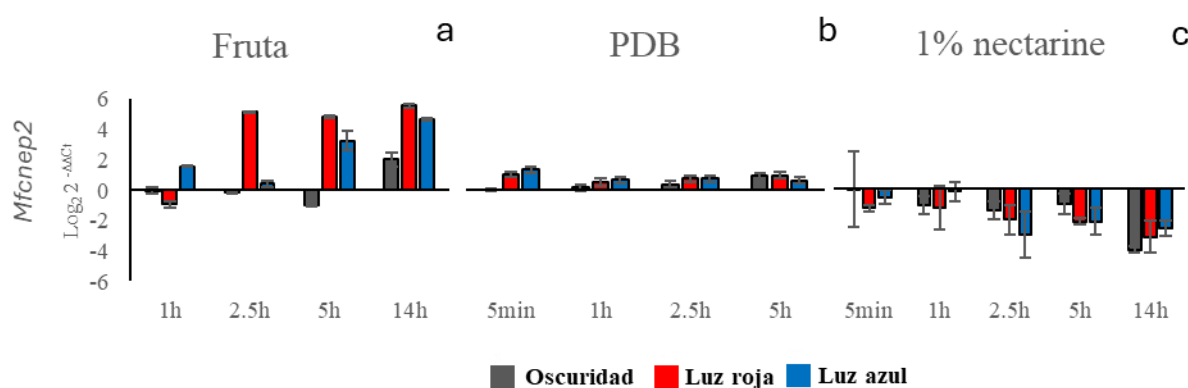


Figura 4.16. Cambios en la expresión génica relativa del gene *Mfcnep2* en (a) fruto, (b) PDB y (c) 1% *nectarine*. La escala es $\text{Log}_2 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ de los valores medios del Fold Change, incluido el error estándar, de tres experimentos separados utilizando el método $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ (Schmittgen y Livak, 2008), con la histona H3 como gen de control endógeno.

4.3. Efecto de la luz sobre la patogénesis de *Monilinia fructigena*. Base genética de la respuesta a la luz

4.3.1. La luz blanca no afectó el desarrollo temprano de la enfermedad, pero influyó en la regulación transcriptómica

Mediante ensayos de infección en fruta se analizó la influencia de la luz blanca sobre el desarrollo de podredumbre parda causada por *M. fructigena* Mgena6, además de su impacto en la actividad transcripcional durante los primeros momentos del desarrollo de la enfermedad. No se encontraron diferencias causadas

por luz en la velocidad de aparición de síntomas causados por *M. fructigena Mgena6* bajo luz blanca durante las primeras etapas de la infección en comparación con el grupo de control en oscuridad. No se detectaron síntomas de la enfermedad en ninguna de las muestras ni condiciones (figura 4.17).



Figura 4.17. Nectarinas inoculadas con discos de PDA con micelio *M. fructigena Mgena6* (A) antes y (B) después del procedimiento de muestreo. No se observaron signos visibles de enfermedad tras el periodo de incubación e irradiación.

Sin embargo, el Análisis de Componentes Principales (PCA) realizado usando los resultados del análisis de expresión diferencial agrupó de manera diferente las muestras que fueron irradiadas con luz en comparación con aquellas que se mantuvieron en total oscuridad (figura 4.18), lo que sugiere que la luz influye en la regulación genética de *M. fructigena Mgena6*.

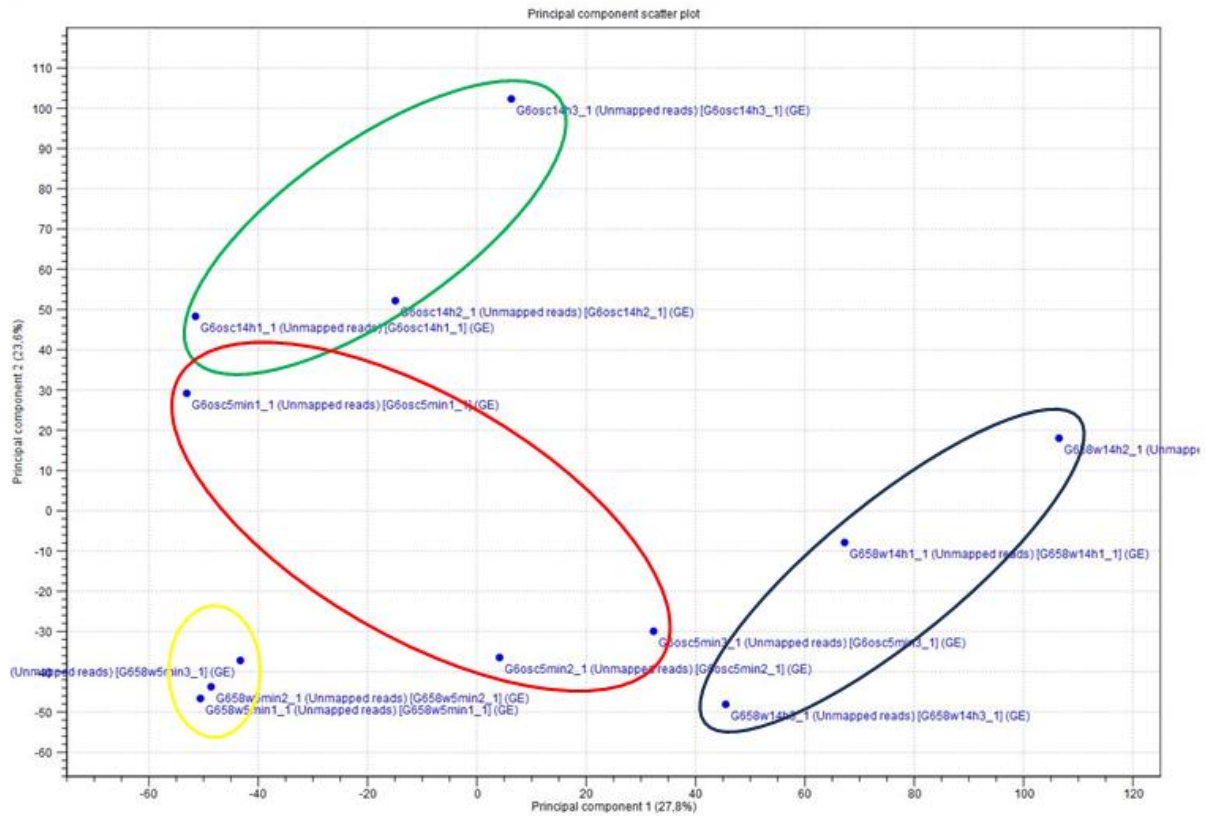


Figura 4.18. Análisis de Componentes Principales (PCA) de los datos de expresión génica global normalizada de *M. fructigena* Mgena6 durante los primeros momentos de la infección tras un periodo de irradiación de luz blanca de 5 minutos o 14 horas. Las réplicas de la misma condición están marcadas con un círculo. Rojo: Oscuridad 5 minutos; Verde: Oscuridad 14 horas; Amarillo: Luz 5 minutos; Azul: Luz 14 horas.

4.3.2. Los genes diferencialmente expresados (DEGs) de *M. fructigena* Mgena6 durante el proceso de infección en respuesta a la luz están asociados con el metabolismo de carbohidratos

Con las lecturas obtenidas de la secuenciación masiva RNAseq del tejido de fruta infectado por *M. fructigena* Mgena6 se llevaron a cabo análisis comparativos de expresión diferencial entre muestras que fueron iluminadas durante 5 minutos y 14 horas, y aquellas que se mantuvieron en oscuridad (grupo control). La luz blanca de espectro completo indujo la expresión de 127 genes mientras reprimió 46 genes tras 5 min de iluminación. Después de 14 h de estímulo lumínico, encontramos 49 genes inducidos por luz (*Light Induced Genes*, LIGs) y 39 genes reprimidos (*Light Repressed Genes*, LRGs). También descubrimos que los DEGs tras 5 min y 14 h de iluminación con luz blanca son muy diferentes, ya que estas muestras sólo comparten 2 LIGs y 1 LRGs (figura 4.19).

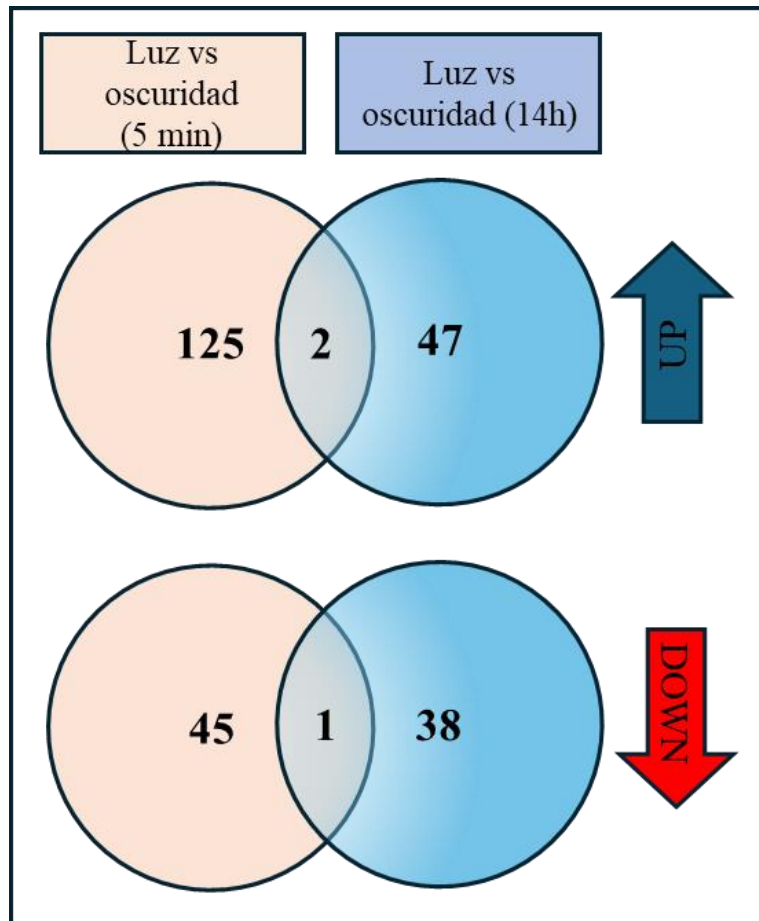


Figura 4.19. Diagramas de Venn de los genes de *M. fructigena* Mgena6 expresados diferencialmente (DEG) tras 5 minutos y 14 h de exposición a la luz blanca durante el proceso de infección temprana de la nectarina. Para cada análisis comparativo, los DEG se muestran como genes regulados al alza (flecha azul) y genes regulados a la baja (flecha roja). El número de DEGs en cada comparación se muestra en los círculos exteriores, mientras que el solapamiento representa los DEGs compartidos entre cada comparación.

Para comprender mejor cómo la luz podría estar involucrada en el proceso regulatorio del desarrollo de la enfermedad, se realizaron análisis de enriquecimiento en términos GO sobre los DEGs encontrados en este análisis comparativo de expresión diferencial. Las comparaciones entre luz y oscuridad en ambos momentos fueron muy similares entre sí. Ambas comparaciones mostraron un enriquecimiento en términos GO relacionados con los procesos metabólicos y catabólicos de carbohidratos, llevados a cabo principalmente en la membrana celular y la región extracelular, con actividades catalíticas, oxidoreductasas e hidrolasas (figura 4.20). Estas son características distintivas de las CAZymes, que

han sido descritas como factores de virulencia en muchos hongos patógenos y en *Monilinia* spp. (Kubicek et al., 2014; Glass et al., 2013; Hall, 1971).

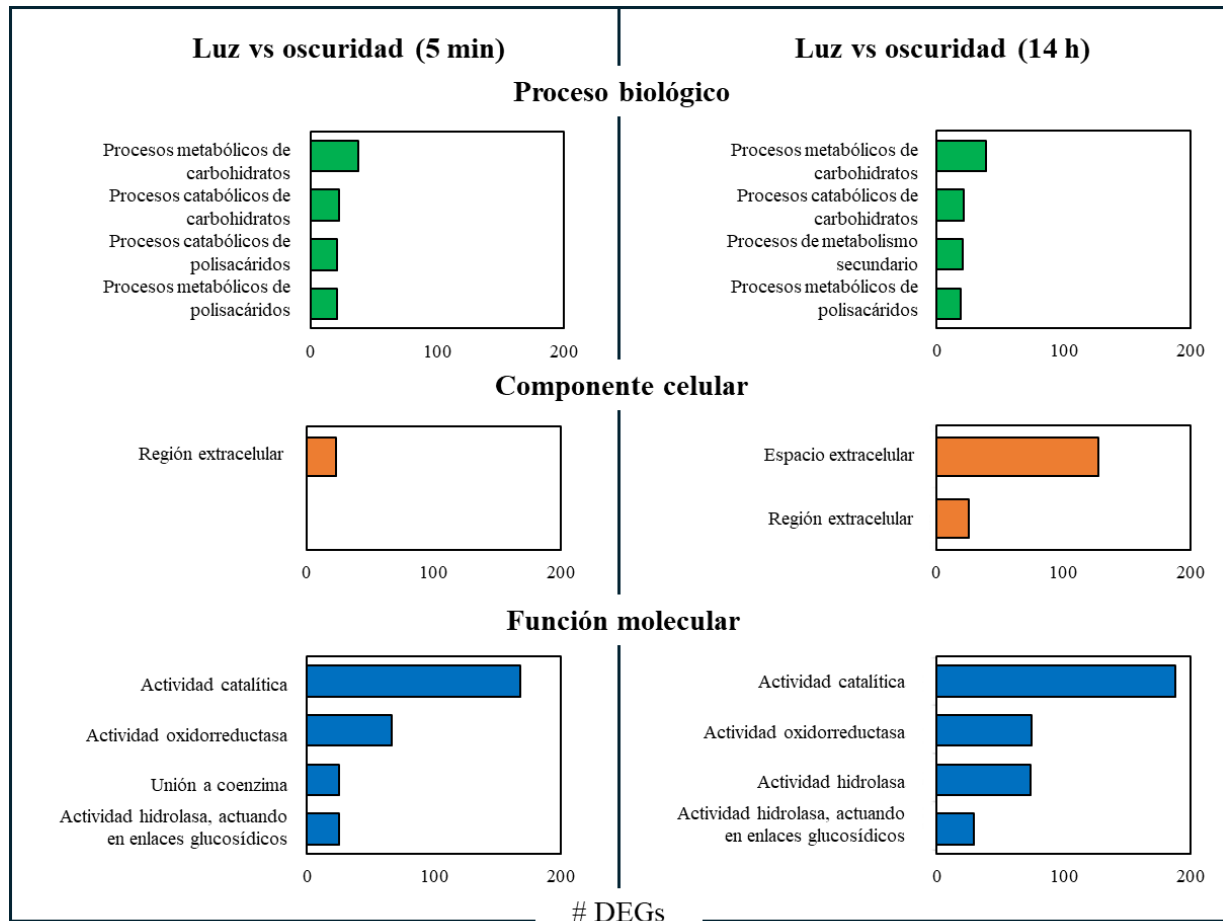


Figura 4.20. Número de DEGs enriquecidos con términos GO divididos por categorías presentes en las comparaciones estadísticas Luz vs Oscuridad (5 min) y Luz vs Oscuridad (14 h).

4.3.3. La expresión génica de *M. fructigena* Mgena6 disminuye después de 14 horas de exposición a luz blanca

La mayor cantidad de DEGs aparecen cuando comparamos las condiciones de luz en distintos momentos. Hubo 90 genes inducidos por la luz (LIGs) y 180 genes reprimidos por la luz (LRGs) en la comparación de 14 h vs 5 min de exposición a luz, y 114 LIGs y 21 LRGs en la comparación de 14 h vs 5 min en oscuridad. Estas comparaciones fueron más similares entre sí que las anteriores, compartiendo 11 LIGs y 6 LRGs (figura 4.21).

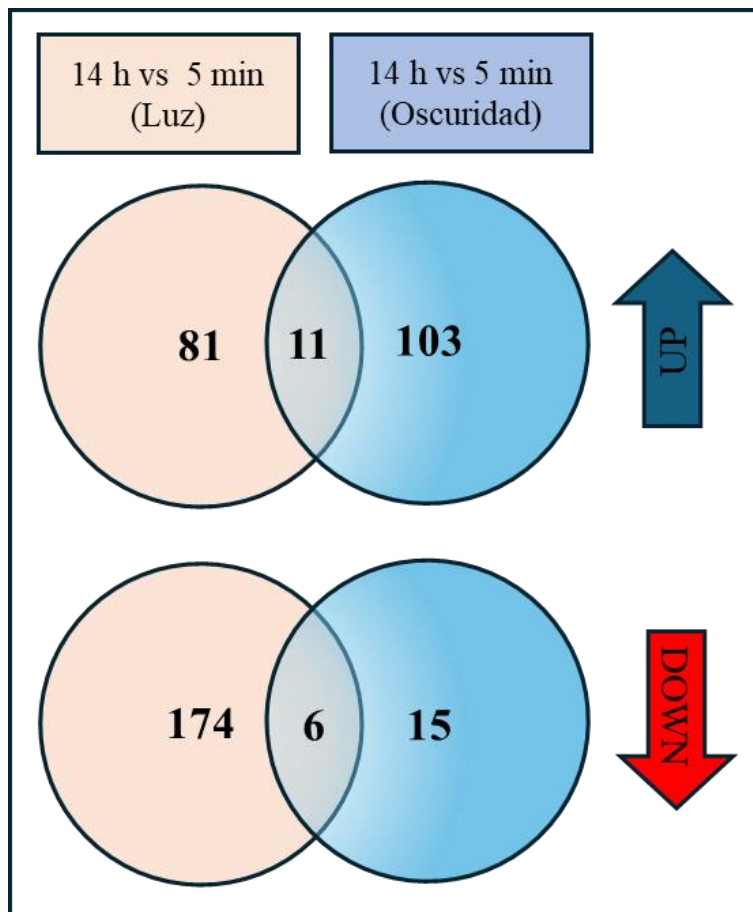


Figura 4.21. Diagramas de Venn de los genes de *M. fructigena* Mgena6 expresados diferencialmente (DEG) tras 14 h de exposición a luz blanca u oscuridad continua utilizando sus respectivas muestras de 5 min como control durante el proceso de infección temprana de la nectarina. Para cada análisis comparativo, los DEG se muestran como genes regulados al alza (flecha azul) y genes regulados a la baja (flecha roja). El número de DEGs en cada comparación se muestra en los círculos exteriores, mientras que el solapamiento representa los DEGs compartidos entre cada comparación.

Muchos de los genes diferencialmente expresados (DEGs) que se describieron previamente como inducidos por la luz (LIGs) a los 5 minutos de irradiación con luz blanca frente a oscuridad, a las 14 h muestran un cambio en su patrón de expresión entrando en la clase de genes regulados a la baja (LRGs). Lo contrario se observó después de 14 horas de oscuridad continua, donde *Mgena6* mostró una cantidad considerable de LIGs (114) y un número reducido de genes clasificados como LRGs (figura 4.21).

Estos resultados muestran que *Mgena6* reacciona al estímulo lumínico durante el proceso de infección, regulando al alza o a la baja diferentes conjuntos de genes en

cada condición. La principal diferencia entre estos conjuntos de comparaciones y los anteriores es que los términos de GO más sobrerrepresentados en la categoría de Proceso Biológico para la comparación de 14 h vs 5 min (Oscuridad) están relacionados con el "proceso metabólico de un solo organismo" en lugar de con el "proceso metabólico de carbohidratos" (figura 4.22). El metabolismo de carbohidratos pierde importancia en la comparación entre oscuridad en diferentes momentos. Esta es una evidencia adicional de que la luz induce un cambio en la regulación génica de las CAZymes.

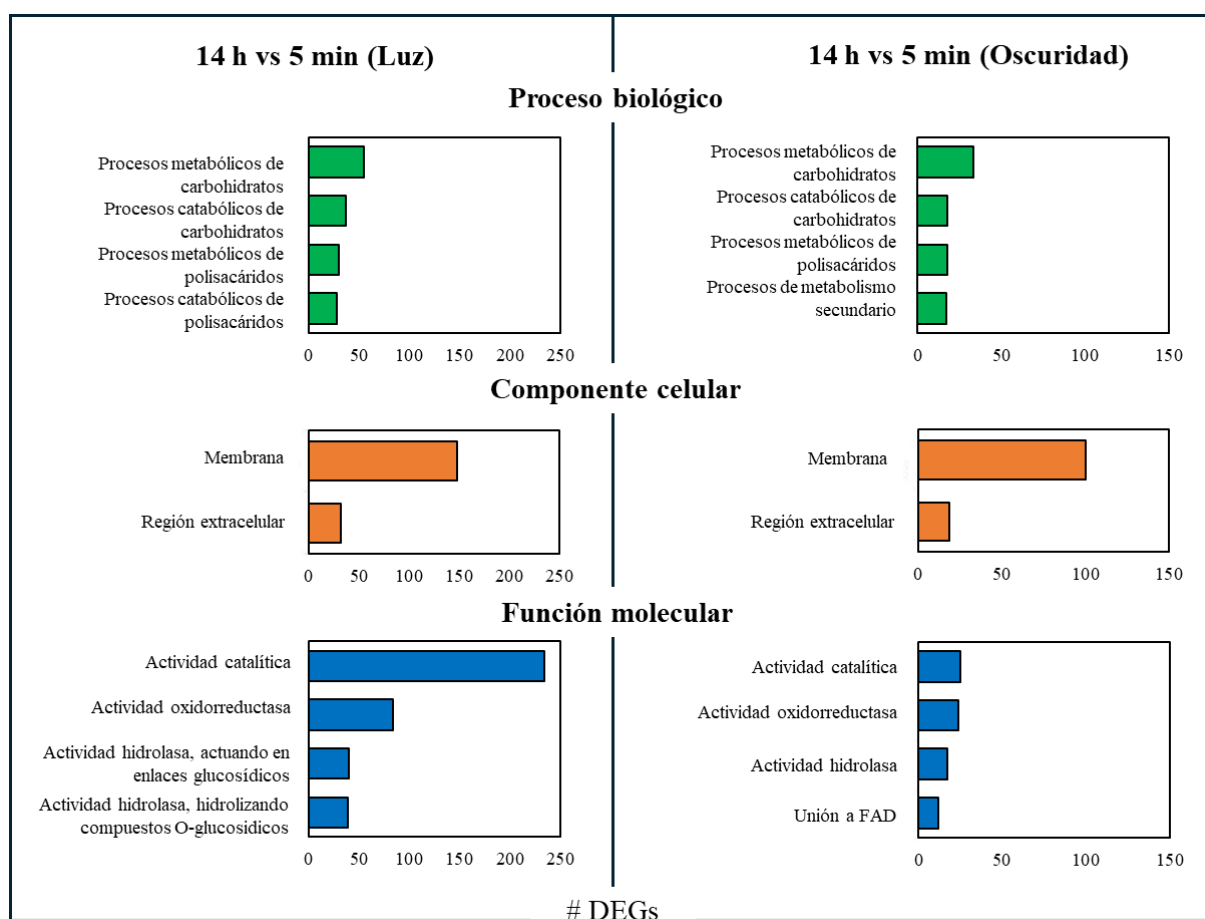


Figura 4.22. Número de DEGs enriquecidos con términos GO divididos por categorías presentes en las comparaciones estadísticas 14 h vs 5 min (Luz) y 14 h vs 5 min (Oscuridad).

4.3.4. Influencia de la luz blanca en la expresión génica de CWDEs

El papel de la luz en la regulación del desarrollo de la enfermedad también se ve respaldado por el hecho de que la luz indujo cambios en los valores de expresión de 47 genes que codifican para CAZymes (tabla 4.5). El grupo que mostró el mayor

número de cambios fue el de las glucósido hidrolasas (GHs), seguido por las carbohidrato esterasas (CEs). La luz tiene un impacto significativo en los patrones de expresión de las GHs. 9 GHs se up-regulan por luz después de un pulso de 5 minutos, mientras que después de 14 horas, 18 GHs se regulan a la baja en comparación con sus niveles de expresión a los 5 minutos de luz blanca (tabla 4.5). Una exposición prolongada a la luz podría ser perjudicial para el desarrollo de la enfermedad, ya que muchos genes codificantes de GHs mostraron menores niveles de expresión después de 14 horas de exposición a la luz (tabla 4.5).

Tabla 4.5. Número de CAZymes expresadas diferencialmente en cada comparación distribuidas por subconjuntos de la familia CAZyme. GHs: Glucósido hidrolasas; GTs: Glicosiltransferasas; AAs: Actividades Auxiliares; CEs: Carbohidrato Esterasas; PLs: Polisacárido Liasas; CBMs: Módulos de unión a carbohidratos.

Familia de CAZyme	N° proteínas predicho	Luz vs Oscuridad (5 min)		Luz vs Oscuridad (14 h)		14 h vs 5 min (Luz)		14 h vs 5 min (Oscuridad)	
		LIGs	LRGs	LIGs	LRGs	LIGs	LRGs	LIGs	LRGs
GHs	211	9	2	2	2	0	18	3	1
GTs	83	2	0	0	2	0	1	3	0
AAs	56	2	0	0	1	5	4	1	3
CEs	25	3	1	1	0	1	3	1	0
PLs	7	1	0	0	0	0	1	0	0
CBMs	47	3	1	1	0	2	4	0	1

Nos centramos entonces en una selección de genes que son reconocidos como claves para la patogénesis de *Monilinia spp.* Sus niveles de expresión generales fueron bajos, con valores promedio de TPM en la luz tan bajos como 1.72 para *Mfgpel1*. En contraste, los TPM de *Mfgpg1*, *Mfgpme3* y *Mfgnep2* seguían siendo altos, con valores de 1537.29, 587.59 y 400.37, respectivamente (tabla suplementaria 4.2). Los genes *Mfgcel1*, *Mfgpg1*, *Mfgpg2*, *Mfgpme3*, *Mfgpme2*, *Mfgpnl2* y *Mfgnep2* fueron fotoinducidos por el pulso de luz de 5 minutos, mientras que los demás no mostraron modificaciones significativas en su expresión génica. Después de 14 horas de exposición a la luz, *M. fructigena* Mgena6 perdió toda la fotoinducción en estos genes, mientras que *Mfgpg2* y *Mfgpnl2* experimentaron una fuerte represión (figura 4.23).

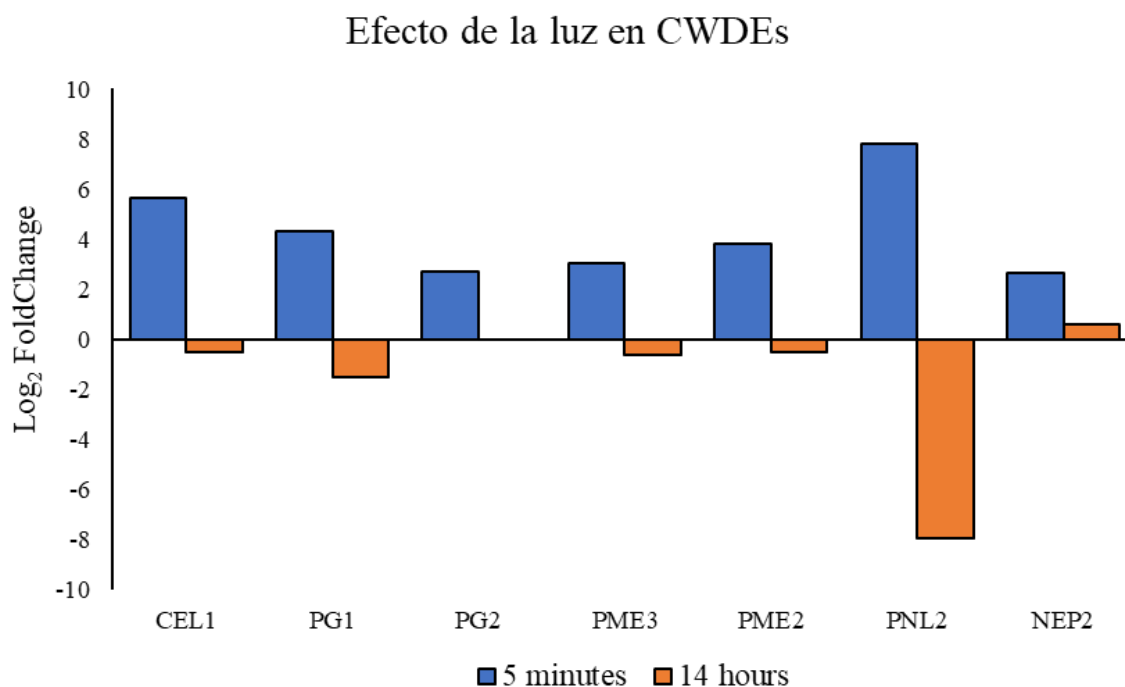


Figura 4.23. Valores de expresión relativa de los transcritos que se expresan de forma significativamente diferente en los intervalos de 5 min y 14 h. La escala es el Log₂ Fold Change usando la oscuridad como control. Un transcrito se considera expresado diferencialmente cuando su valor absoluto Log₂ FC es superior a 2, su valor p FDR es inferior a 0,05 y su valor TPM es superior a 20 en cualquier condición.

4.3.5. Influencia de la luz en los genes asociados a la respuesta a luz en *M. fructigena* Mgena6

A pesar del impacto que la luz tuvo en la expresión génica de *M. fructigena* Mgena6, notamos que los términos de GO relacionados con la fotorrecepción o los procesos asociados no eran comunes en los DEGs de *M. fructigena* Mgena6. Estos resultados sugieren que los mecanismos mediante los cuales *M. fructigena* Mgena6 reconoce el estímulo luminoso no están siendo influenciados por la luz misma. Para corroborar este fenómeno, buscamos manualmente y verificamos el estado transcripcional de la maquinaria de respuesta a luz en nuestros análisis de expresión diferencial.

Encontramos que 6 de los 14 genes bajo análisis fueron fotoinducidos después de 5 minutos de exposición a la luz, pero solo cuatro mostraron valores de TPM dentro de nuestros requisitos para ser considerados genes inducibles por luz (tabla suplementaria 4.3). En la comparación de 14 h, *Mfgvvd1* fue el único gen fotoinducible (tabla suplementaria 4.3). El único gen que se encontró fotoinducible

en ambos momentos fue *Mfgvvd1*. Otros genes que mostraron signos de inducción por luz en *M. fructigena* *Mgena6* son *Mfgfrq1*, *Mfgcry1*, *Mfglov3* y *Mfglov4*. Estos genes fueron regulados al alza a los 5 minutos de irradiación con luz, pero perdieron su fotoinducción después del pulso de 14 horas de luz (figura 4.24).

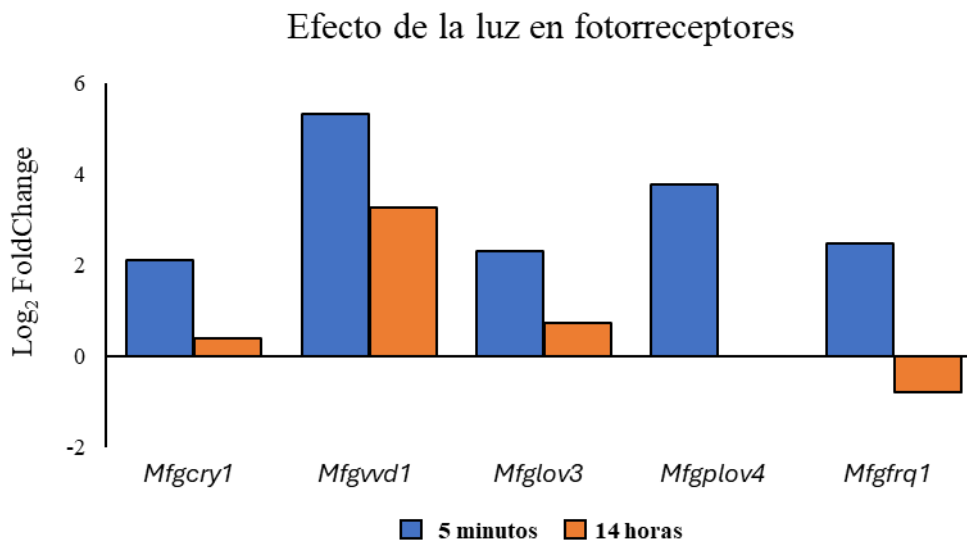


Figura 4.24. Valores de expresión relativa de los transcritos que se expresan de forma significativamente diferente en los intervalos de 5 min y 14 h. La escala es el Log_2 “Fold Change” usando la oscuridad como control. Un transcrito se considera expresado diferencialmente cuando su valor absoluto Log_2 FC es superior a 2, su valor p FDR es inferior a 0,05 y su valor TPM es superior a 20 en cualquier condición.

4.3.6. Validación de los datos mediante RT-qPCR

Se estudiaron los niveles de expresión de dos genes que codifican para CAZymes, *Mfgpg1* y *Mfgpme3*, y el NLP *Mfgnep2* mediante RT-qPCR para comprobar si siguen el mismo patrón de expresión observado en el análisis de RNAseq. Utilizamos niveles de *Fold Change* encontrados en la comparación de 14 h vs 5 min en oscuridad y el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ para la comparación relativa de los niveles de expresión en RT-qPCR, utilizando las mismas muestras de 5 min como controles, al igual que en las comparaciones del conjunto de muestras de secuenciación de ARN, y el gen *H3* como gen de referencia. En ambos casos encontramos cierto paralelismo entre los datos de expresión relativa procedente de experimentos de secuenciación de ARN y mediante RT-qPCR (figura 4.25).

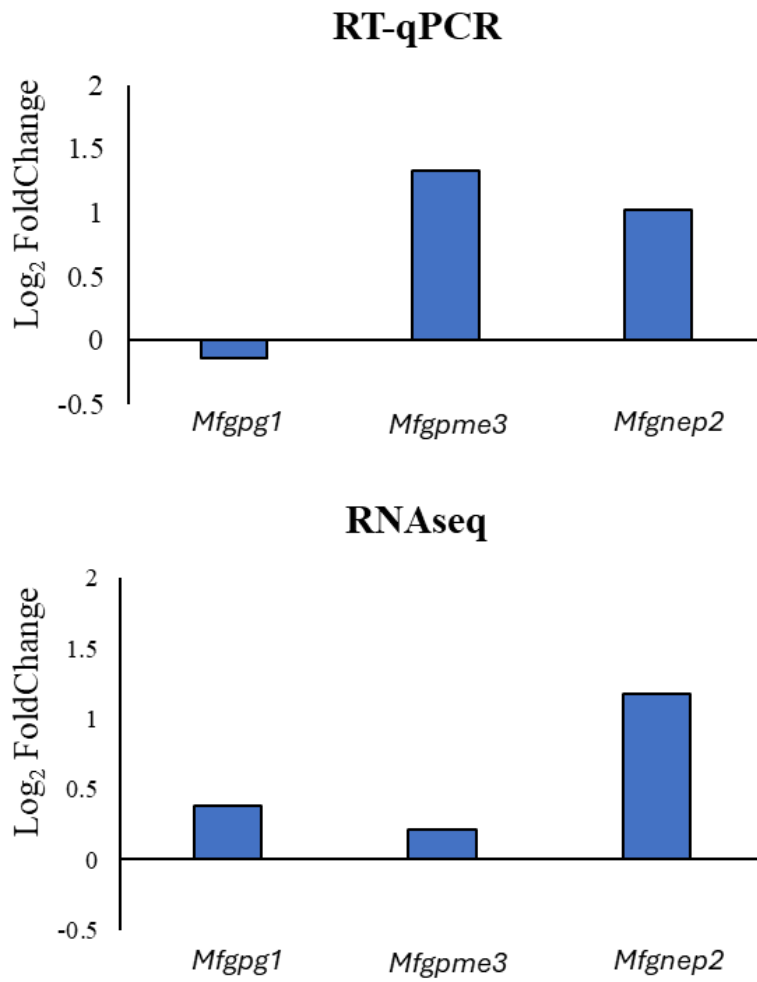


Figura 4.25. Patrones de expresión observados para dos genes codificantes de CAZymes y la toxina formadora de poros **Nep2** utilizando dos métodos diferentes, RT-qPCR y RNAseq.

4.4. Comparativa del comportamiento de las tres principales especies de *Monilinia* en huertos de España en los procesos tempranos de infección sobre nectarina.

4.4.1. Influencia de diferentes longitudes de onda de luz en la tasa de crecimiento de *M. fructicola* y *M. fructigena*

Con el objetivo de evaluar las posibles diferencias en la tasa de crecimiento experimentada por distintas especies de *Monilinia* spp. en respuesta a distintas condiciones de iluminación, probamos el efecto de luces de diferente longitud de onda y fotoperiodo sobre crecimiento de *M. fructicola* 38C y *M. fructigena* Mgena6. En general, *M. fructicola* 38C creció más rápido que *M. fructigena* Mgena6 en todas las condiciones probadas (figura 4.25). La luz roja siempre indujo un aumento en la tasa de crecimiento diaria de *M. fructicola* 38C, mientras que las otras cuatro bandas de iluminación (luz blanca de espectro completo, azul, ultravioleta cercano y verde) causaron una disminución similar en la tasa de crecimiento en relación con el grupo control mantenido en oscuridad. La luz ultravioleta cercano fue significativamente más perjudicial para el crecimiento de *M. fructicola* 38C bajo el fotoperíodo de 12 h de luz (figura 4.26).

M. fructigena Mgena6 mostró una respuesta a la luz diferente. La exposición a luz tuvo un gran impacto en la tasa de crecimiento diaria de *M. fructigena*. Durante el fotoperíodo de 8 h de luz, todas las luces indujeron una tasa de crecimiento significativamente más lenta en *M. fructigena* Mgena6. La luz roja y azul causaron diferencias menores en la tasa de crecimiento en comparación con el grupo control (figura 4.26). Por otro lado, solo las luces blanca, verde y ultravioleta cercano indujeron una disminución significativa en la tasa de crecimiento durante el fotoperíodo de 12 h de luz en *M. fructigena* Mgena6. La luz roja y azul no mostraron diferencias con el grupo control según la prueba de rangos múltiples de Student-Newman-Keuls (Figura 4.26).

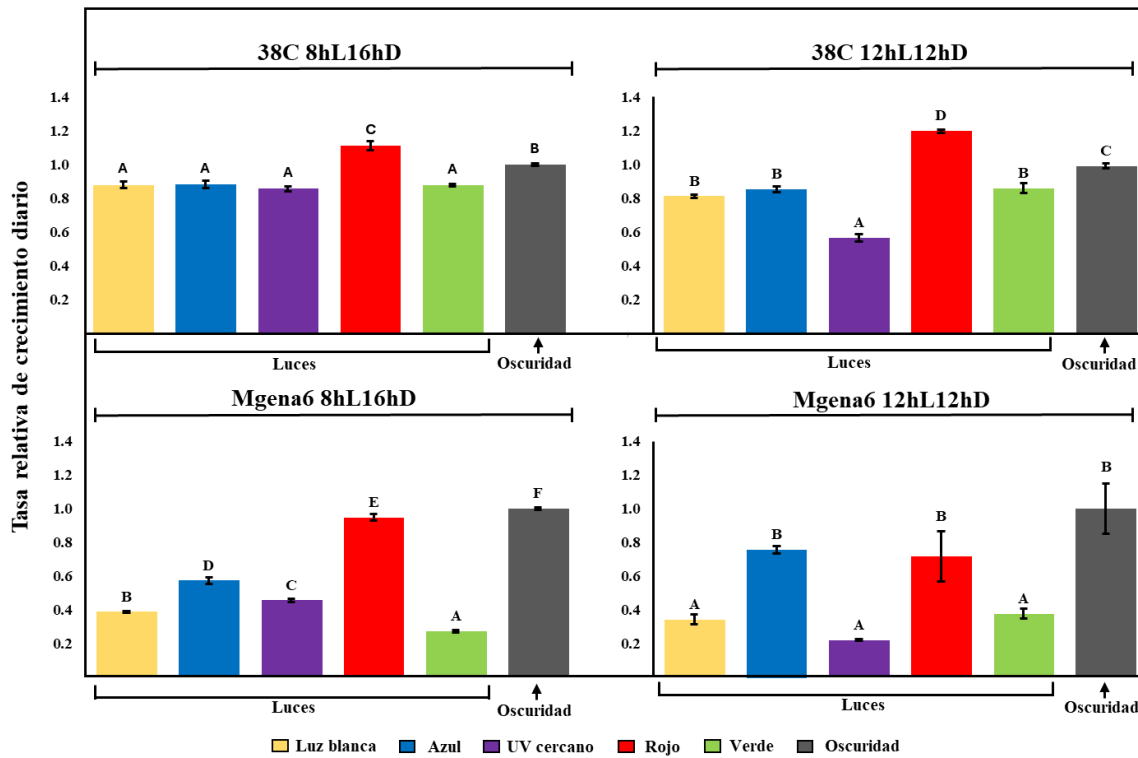


Figure 4.26. Efecto de cinco longitudes de onda de luz (roja, azul, verde, UV cercana y blanca de espectro completo) y dos fotoperiodos de luz diferentes sobre la tasa de crecimiento micelial de *M. fructicola* 38C y *M. fructigena* Mgena6 en PDA tras siete días de incubación. La escala es la tasa de crecimiento relativa al control en oscuridad total para cada experimento. Los datos presentados son la media y el error estándar de cinco réplicas biológicas. Las barras con la misma letra en cada gráfico no fueron significativamente diferentes mediante la prueba de rango múltiple de Student-Newman-Keuls.

Se probó la influencia de luz de cinco longitudes de onda diferentes durante las primeras etapas de infección de *M. fructicola* 38C, *M. laxa* 8L y *M. fructigena* Mgena6. Se inocularon nectarinas no heridas y se incubaron durante un período de 24 h en oscuridad, seguidas de 14 h de exposición directa a la luz. En la oscuridad, no se observaron síntomas de la enfermedad en el grupo control para ninguna de las tres especies. Solo *M. fructicola* 38C mostró diferencias en la incidencia de la enfermedad cuando se incubó bajo luz roja y azul (Figura 4.27).

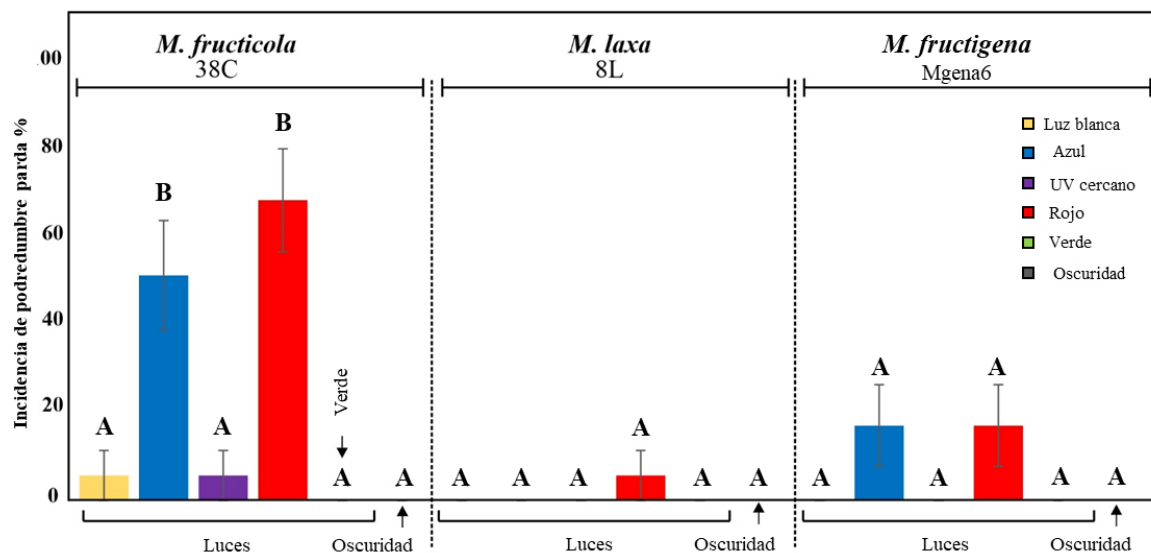


Figura 4.27. Incidencia de la podredumbre parda en nectarinas causada por tres especies diferentes de *Monilinia* spp. tras un periodo de incubación de 24 h en completa oscuridad y 14 h bajo irradiación roja, azul, verde, UV cercana y blanca de espectro completo. La escala fue la media y el error estándar del porcentaje de puntos de inoculación que mostraban síntomas tempranos de la enfermedad a partir de dos experimentos, tres frutos cada uno. Las barras con la misma letra en cada gráfico no fueron significativamente diferentes mediante la prueba de comparación múltiple de Bonferroni.

4.4.2. Diferencias en el complejo de fotorrecepción entre especies de *Monilinia*

Los genes que codifican para los fotorreceptores y las proteínas asociadas fueron descritos previamente para *M. laxa* por Rodríguez-Pires et al. (2021b). Usando esta información y la secuencia genómica disponible de *M. fructigena* Mgena6, comparamos las similitudes y la completitud del complejo de fotorreceptores entre las tres especies. Las tres especies de *Monilinia* compartieron un conjunto idéntico de genes codificadores de fotorreceptores, incluyendo tres fitocromos (*phy1*, *phy2* y *phy3*) para la detección de luz roja / luz en el infrarrojo lejano, dos opsinas (*op1* y *op2*) para la detección de luz verde, tres genes que codifican proteínas que contienen dominios Light, Oxygen, Voltage (LOVs) para la detección de luz azul (*wc1*, *wc2* y *vvd1*), y finalmente dos criptocromos para la detección de luz azul / luz cercana al UV (*cry1* y *cry2*). También encontramos en el genoma de las tres especies secuencias codificantes de cuatro proteínas de la familia velvet (*vel1*, *vel2*, *vel3* y *vel4*) (figura 4.28).

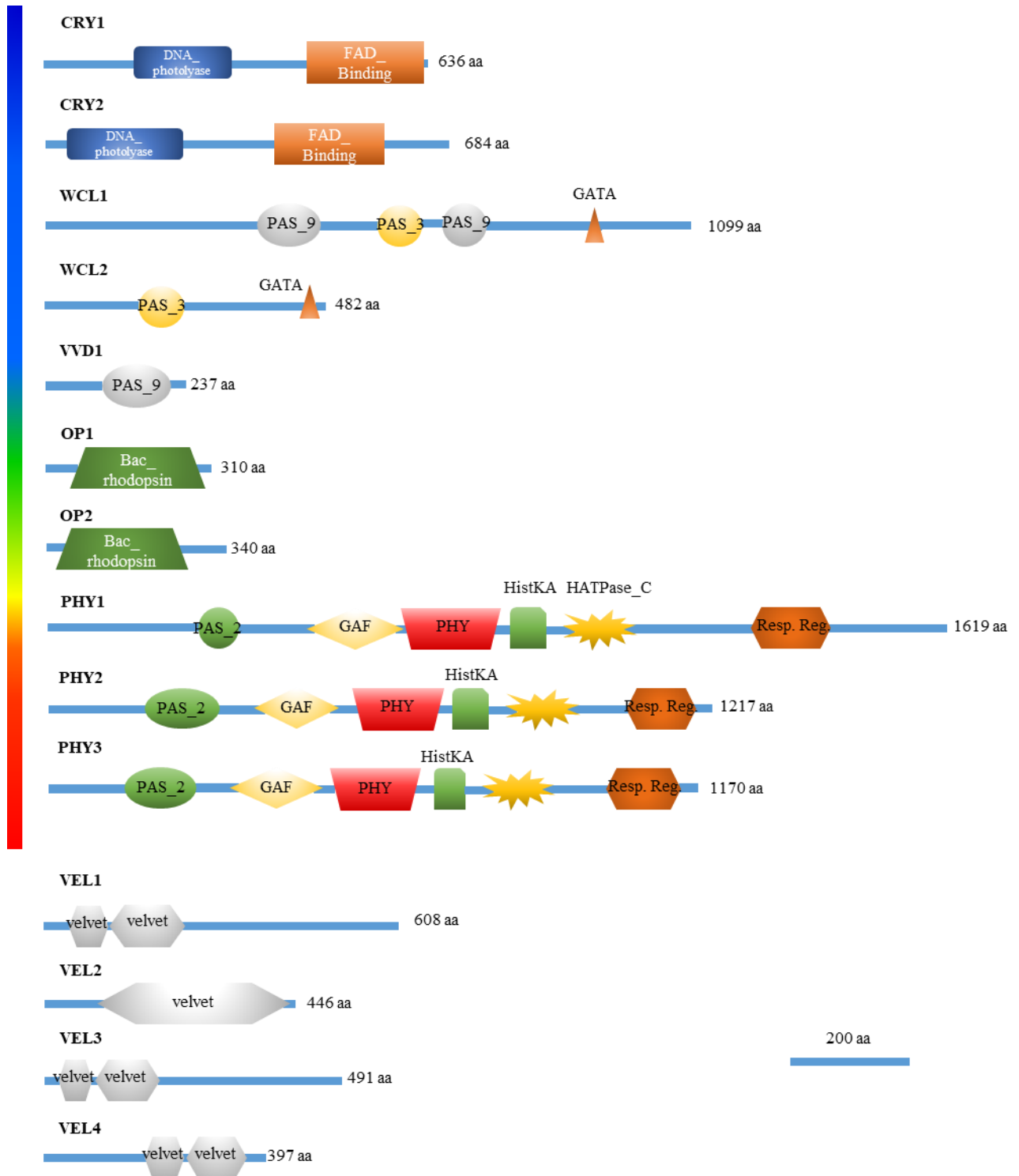


Figura 4.28. Arquitectura de los dominios predichos en fotorreceptores y proteínas de la familia velvet en *Monilinia fructigena* Mgen6. DNA_photolyase (PF00875), FAD_binding (PF03441), PAS_9 (PF13426), PAS_3 (PF08447), GATA (PF00320), Bac_rhodopsin (PF01036), PAS_2, (PF08446), GAF (PF01590), PHY (PF00360), HisKA (PF00512), HATPase_C (PF02518), Response_reg (PF00072), Velvet (PF11754).

4.4.3. Anotación GO e identificación de CAZymes y CWDEs

Las diferencias en el desarrollo de la enfermedad producida por cada especie en respuesta a luz sugieren patrones de expresión únicos para las enzimas que *Monilinia* emplea para descomponer las paredes celulares de nectarinas. Para comprender este fenómeno, identificamos la maquinaria enzimática posiblemente involucrada en la degradación de la pared celular dentro del proteoma predicho de las tres especies de *Monilinia* utilizadas en el estudio. Se realizó la anotación funcional GO del proteoma predicho para las tres especies de *Monilinia*, complementada con búsquedas en el servidor dbCAN3 para detectar enzimas activas en carbohidratos (CAZymes).

Tabla 4.6. Resultados de las búsquedas en el metaservidor dbCAN3. Número de enzimas identificadas incluidas en las siguientes categorías: (GHs) Glucósido Hidrolasas, (GTs) Glicosiltransferasas, (PLs) Polisacárido liasas, (CEs) Carbohidrato esterasas, (AAs) Actividades Auxiliares y (CBMs) Módulos de Unión a Carbohidratos. SignalP indica el número de CAZymes con un péptido señal identificable.

	38C	8L	Mgena6
GHs	228	219	211
GTs	89	86	83
AAs	63	58	56
CEs	27	28	25
PLs	7	6	7
CBMs	46	46	47
SignalP	177	161	159
Total	414	398	383
% del genoma	3,96	4,15	4,00

Los CAZymes representan el 3.96%, 4.15% y 4% del proteoma predicho de *M. fructicola* 38C, *M. laxa* 8L y *M. fructigena* Mgena6, respectivamente. Las tres especies de *Monilinia* tienen conjuntos similares de cada tipo de CAZyme, incluyendo glucósido hidrolasas (GHs), glicosiltransferasas (GTs), polisacárido

liasas (PLs), carbohidrato esterasas (CEs), actividades auxiliares (AAs) y módulos de unión a carbohidratos (CBMs) (Tabla 4.6). Para las tres especies, los CAZymes más abundantes fueron los GHs, seguidos por los GTs. Encontramos que muchas enzimas fueron predichas con un módulo catalítico posiblemente involucrado en la descomposición, biosíntesis o modificación de carbohidratos y glicoconjugados (GHs, GTs, PLs y CEs) y uno o más módulos catalíticos o no catalíticos con funciones auxiliares (AAs y CBMs) (Tabla 4.6). Se seleccionaron ocho posibles genes codificantes para CAZymes para los análisis de expresión por RT-qPCR. Estos genes fueron: tres GHs (*pg1*, *pg6* y *cell*), dos PLs (*pn11* y *pn12*), y tres CEs (*pme3*, *pme2* y *cut1*).

4.4.4. La luz roja influye en la expresión de los CAZymes en las especies de *Monilinia*

La luz roja parece desempeñar un papel activo en la regulación del desarrollo de la podredumbre parda. Para probar la extensión de su potencial rol regulador, se realizó un análisis de expresión génica en un grupo selecto de CWDEs mediante RT-qPCR en las tres especies de *Monilinia* utilizando muestras de fruta incubadas bajo luz roja y en total oscuridad. Siete de los 8 genes de CAZyme probados, exceptuando *pg6*, se expresaron en las tres especies durante las primeras etapas de la infección de la podredumbre parda. Estos genes fueron fotoinducibles por luz roja en diversos grados, dependiendo de la especie, con sobreexpresión observada en 6 genes de *M. fructicola* 38C y 4 genes en *M. laxa* 8L, mientras sólo uno de genes mostró fotoinducción en *M. fructigena* *Mgena6* (figura 4.29 y 4.30). La expresión genética aumentó con el tiempo cuando *M. fructigena* *Mgena6* se mantuvo en oscuridad total (muestras del grupo control) en 3 genes (figuras 4.29 y 4.30).

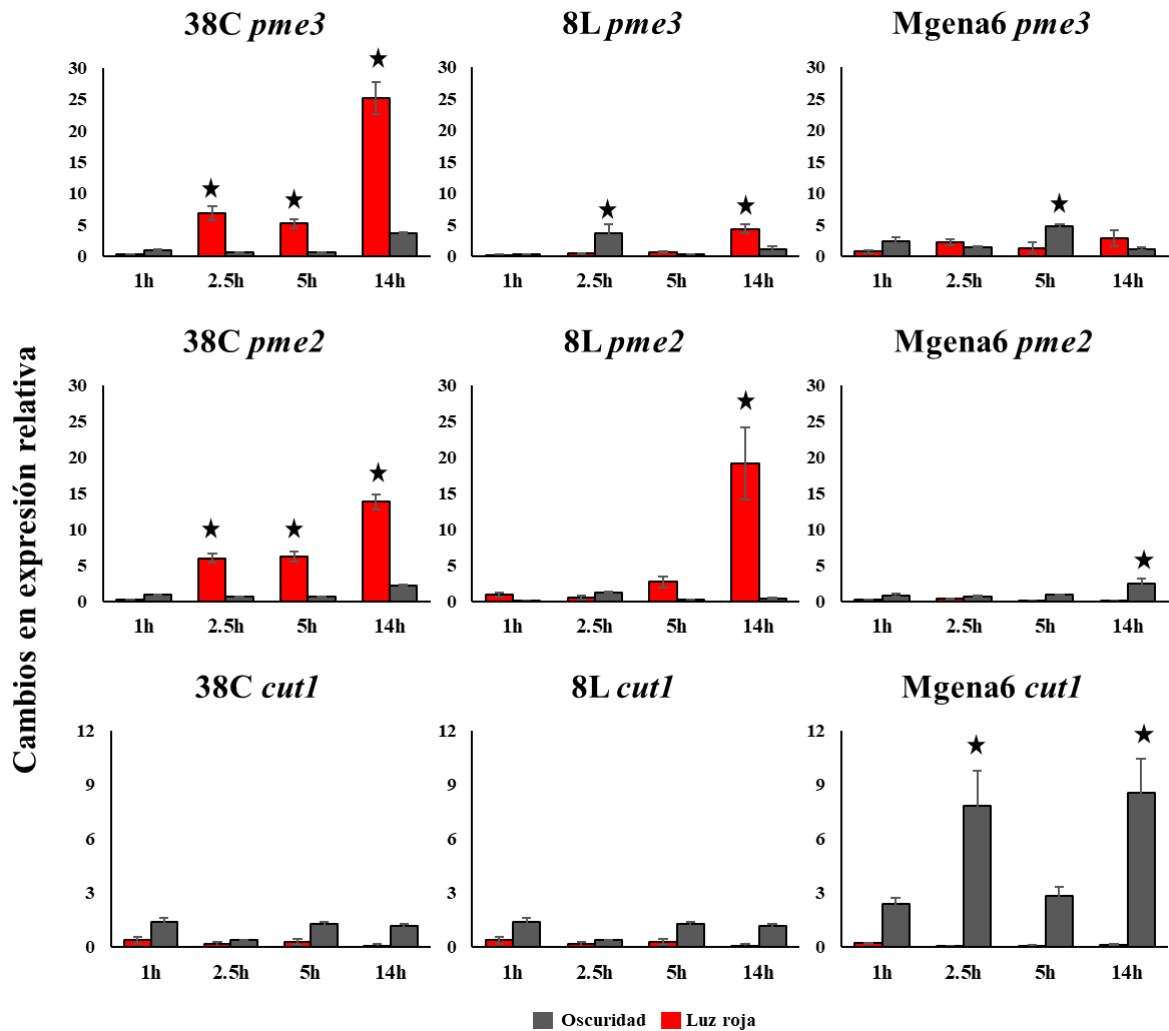


Figura 4.29. Cambios en la expresión génica relativa de los genes *pme3*, *pme2* y *cut1* en *M. fructicola* 38C, *M. laxa* 8L y *M. fructigena* Mgena6 inducidos por la luz roja en las primeras fases de la infección de la nectarina. La escala son los valores medios del *Fold Change*, incluido el error estándar, de tres experimentos separados utilizando el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Schmittgen y Livak, 2008), con la histona H3 como gen de control endógeno. Las diferencias estadísticamente significativas según la prueba de Student-Newman-Keuls entre las muestras y el grupo de control están marcadas con una estrella.

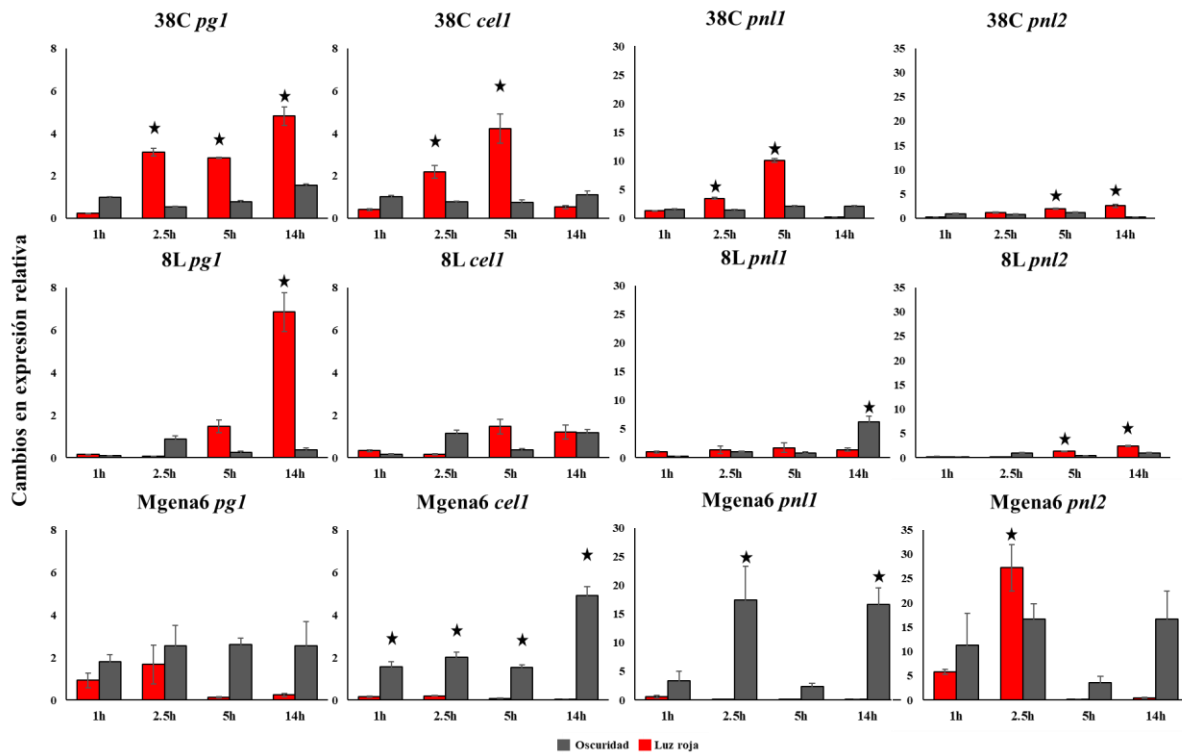


Figura 4.30. Cambios en la expresión génica relativa cuatro genes codificantes para CAZymes en *M. fructicola* 38C, *M. laxa* 8L y *M. fructigena* Mgena6 inducidos por la luz roja en las primeras fases de la infección de la nectarina. Datos representados como los valores medios del FC, incluido el error estándar, de tres experimentos separados. Calculado utilizando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Schmittgen y Livak, 2008), con la histona H3 como gen de control endógeno. Las diferencias estadísticamente significativas según la prueba de Student-Newman-Keuls entre las muestras y el grupo de control están marcadas con una estrella.

Encontramos diferencias en los patrones de expresión génica entre genes de la misma familia de CAZymes. Los genes CE *pme3* y *pme2* fueron fotoinducibles en *M. fructicola* 38C y *pme2* en *M. laxa* 8L, comenzando desde tan solo 2.5 hpi, mientras que no se observó fotoactivación de este par de genes en *M. fructigena* Mgena6 (figura 4.29). *cut1* se mantuvo en silencio por la luz roja en todas las especies probadas, pero en *M. fructigena* Mgena6 su expresión génica aumentó con el tiempo en la oscuridad, mostrando una vez más que *M. fructigena* sigue un patrón de expresión diferente (figura 4.29).

Se encontró un patrón transcripcional similar para los genes GH *pg1* y *cell1* en *M. fructicola* 38C y *M. laxa* 8L en respuesta a la excitación por luz roja, a diferencia de *M. fructigena* Mgena6. La luz roja aumentó la expresión de *pg1* entre 2.5 y 14 hpi y de *cell1* entre 2.5 y 5 hpi en *M. fructicola* 38C (figura 4.30). La luz roja aumentó la expresión génica del gen *pg1* a las 5 y 14 hpi, pero no la del gen *cell1* en *M. laxa*

8L (figura 4.30). En *M. fructigena*, no se observó fotoinducción de los GHs por luz roja, mientras que aumentó con el tiempo en la oscuridad (figura 4.30).

La expresión de los genes PL *pnl1* y *pnl2* también fue dependiente de la especie, con ambos genes experimentando fotoinducción por luz roja en *M. fructicola* 38C y solo *pnl2* en *M. laxa* 8L y en *M. fructigena* a 2.5 hpi (figura 4.30). El patrón de expresión de *pnl1* fue similar al de los otros genes que codifican para CAZymes en *M. fructigena* *Mgena6*, con expresión aumentando lentamente con el tiempo en oscuridad continua (figura 4.30).

4.4.5. Miembros de la familia NLP en el genoma de *Monilinia* spp.

Las NLPs actúan como factores de patogenicidad en muchas especies de hongos, y las especies de *Monilinia* cuentan con dos genes diferentes que codifican NLPs entre su arsenal de efectores que podrían influir en el desarrollo de la podredumbre parda. La presencia de las NLPs NEP1 y NEP2 en los proteomas predichos de las tres especies de *Monilinia* fue confirmada mediante una búsqueda BlastP en la base de datos de UniProt, como se describió en (Schumacher et al. 2020). Esta búsqueda devolvió solo 2 hits confiables por genoma, correspondientes a los genes que codifican *nep1* y *nep2* en las tres especies de *Monilinia* (Figura 4.31a). Tanto NEP1 como NEP2 tienen un péptido señal (SP), lo que promueve la secreción eficiente de la proteína, con un sitio de escisión propuesto entre los aminoácidos 20 y 21 para NEP1, y entre los residuos 29 y 30 para NEP2 en las tres especies de *Monilinia* estudiadas (Figs. 4.31b y c).

La comparación de los dos homólogos de NEP en las tres especies de *Monilinia* mostró un alto nivel de conservación, con ligeras diferencias en la secuencia característica AIMYSWYFPKDMPSTDFGHRHDWE, que define esta familia de proteínas (Figura 4.31b y c, recuadrado).

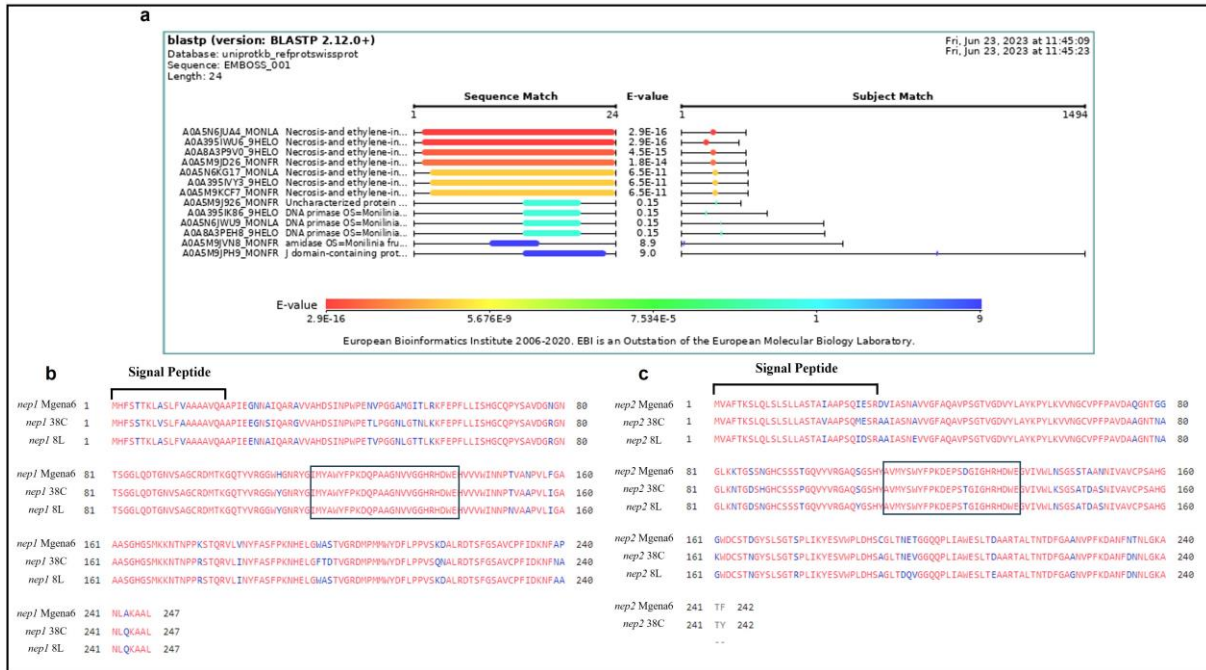


Figura 4.31. Caracterización de NLPs en *Monilinia* spp. (a) Resultados de NCBI blastp para el polipéptido descrito en Schumacher et al. (2020) (b) Alineamiento clustal múltiple de secuencias para *nep1* en *M. fructigena* Mgena6, *M. fructicola* 38C y *M. laxa* 8L (c) Alineamiento clustal múltiple de secuencias para *nep2* en *M. fructigena* Mgena6, *M. fructicola* 38C y *M. laxa* 8L. Los cambios en la secuencia de aminoácidos se resaltan en azul.

Obtuvimos predicciones de estructura 3D para NEP1 y NEP2 presentes en *M. fructicola* (A0A5M9KCF7 y A0A5M9JD26), *M. laxa* (A0A5N6KG17 y A0A5N6JUA4) y *M. fructigena* (A0A395IVY3) de la base de datos AlphaFold de estructuras proteicas. Encontramos que la proteína NEP2 depositada para *M. fructigena* (A0A395IWU6) era 26 aminoácidos más corta que la presente en nuestro genoma de *M. fructigena* Mgena6, y esta eliminación se encontraba entre los aminoácidos 62 y 63. Por lo tanto, utilizamos las herramientas predictivas de AlphaFold para modelar la estructura 3D de la proteína NEP2 del genoma de *M. fructigena* Mgena6. AlphaFold proporcionó predicciones confiables para las estructuras 3D de los homólogos de NEP1 y NEP2 de las tres especies, mostrando una región N-terminal desorganizada que albergaba el SP, seguida por 15 aminoácidos que precedían el dominio globular de estas proteínas (Figs. 4.32a y b).

Al mapear los cambios en los aminoácidos en cada homólogo, vimos que la mayoría de los cambios en los aminoácidos resultan en cambios neutrales para la estructura de la proteína, ya que todas las cadenas laterales de esos aminoácidos están orientadas hacia la superficie de la proteína. Sin embargo, en la proteína NEP2 de *M. fructicola* 38C, la alanina en la posición 190 de *M. laxa* 8L y *M. fructigena*

Mgena6 fue reemplazada por cisteína, lo que resultó en un cambio de un aminoácido no polar a uno polar. AlphaFold no mostró evidencia de que este cambio pudiera desestabilizar la molécula, ya que la cadena lateral no colisiona con ninguna otra cadena y forma nuevos enlaces que podrían fortalecer la estabilidad estructural de la proteína (figura 4.33). Todas las estructuras secundarias, consistentes en un sándwich β central flanqueado por α -hélices, como se describe en estructuras cristalinas modelo (Pirc et al., 2022), permanecieron en su mayoría sin cambios entre las especies (Figura 4.32).

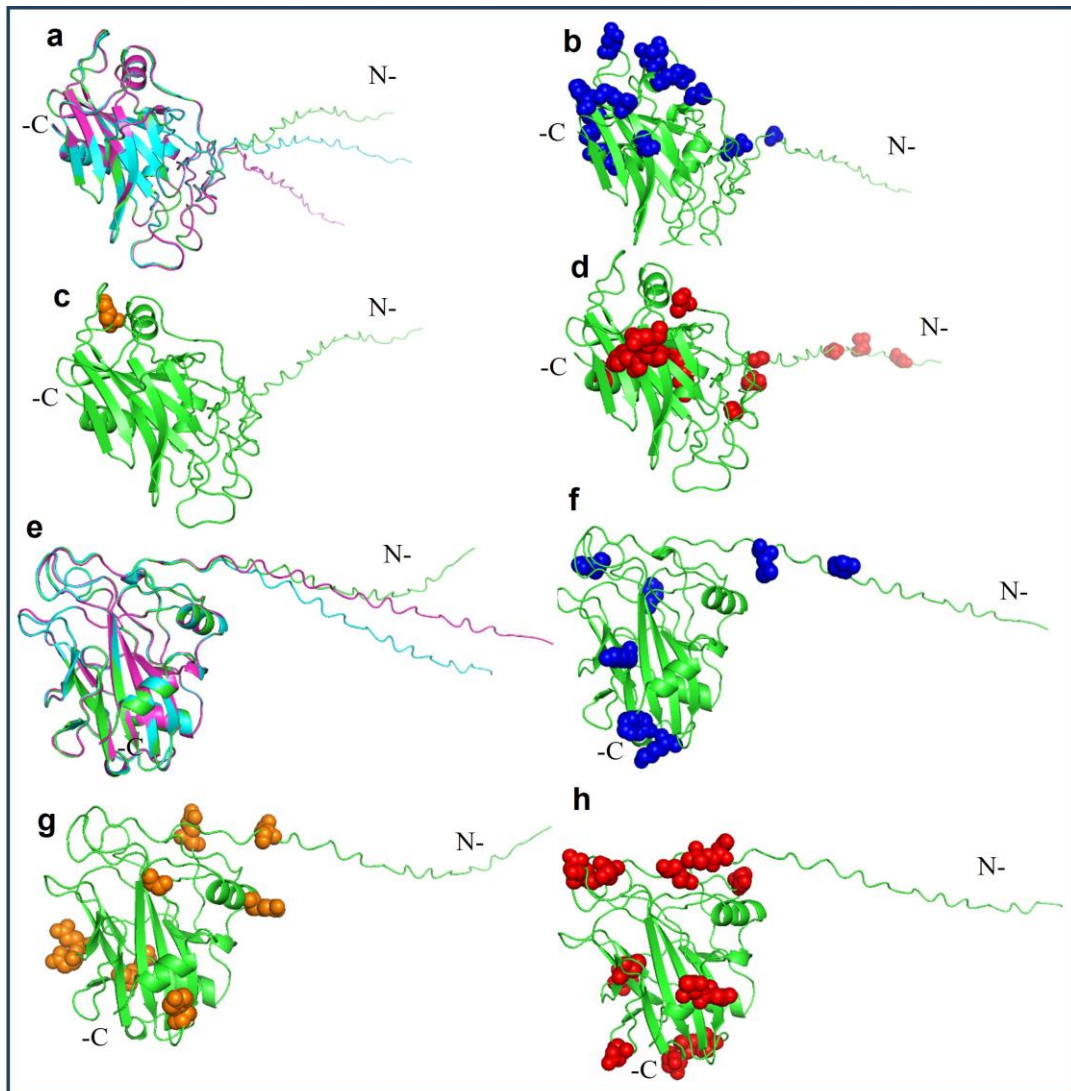


Figura 4.32. Estructura 3D de las proteínas NEP1 y NEP2 según la predicción de AlphaFold, incluido el péptido señal. Alineación de la estructura 3D de (a, b, c, d) NEP1 y (e, f, g, h) NEP2 para las tres *Monilinia* spp. Código de colores: verde claro para *M. laxa* 8L; cian para *M. fructicola* 38C y magenta claro para *M. fructigena* Mgena6. Las regiones conservadas se representan en verde, mientras que los cambios específicos en la secuencia de aminoácidos se representan como (b y f) esferas azules en *M. fructigena* Mgena6; (c y g) esferas naranjas en *M. laxa* 8L; y (d y h) esferas rojas en *M. fructicola* 38C.

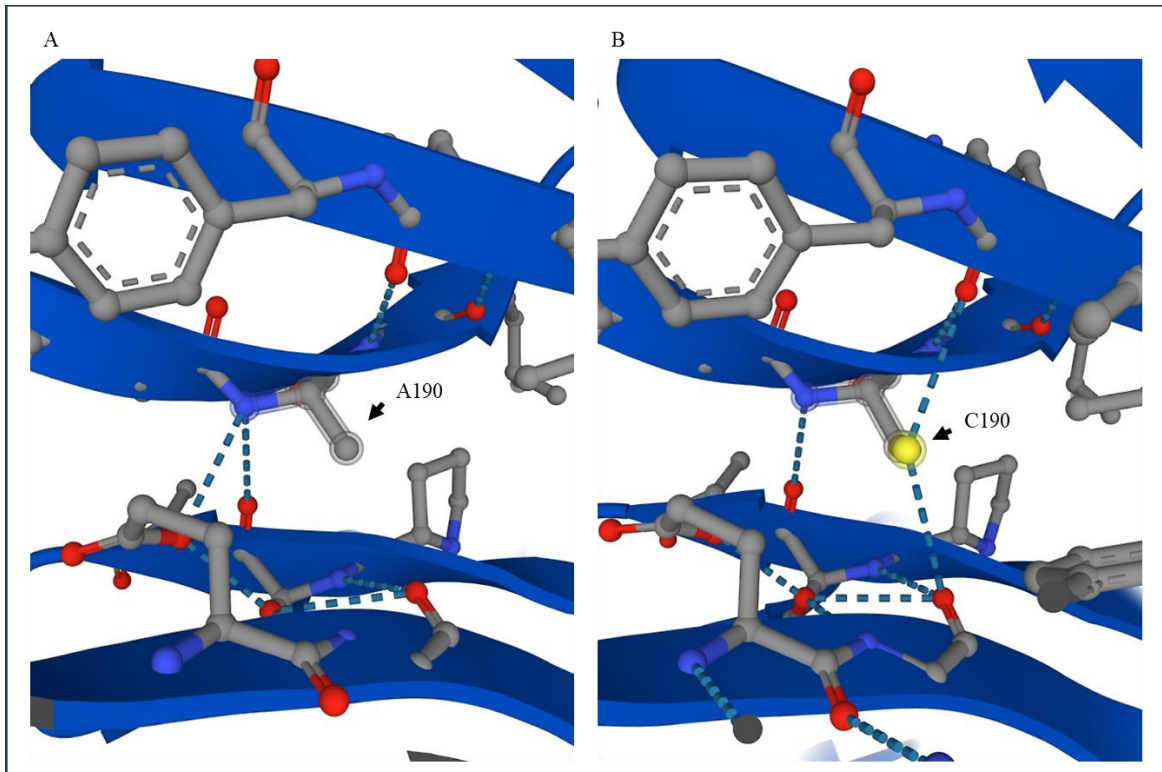


Figura 4.33. Predicción estructural de los efectos de la presencia de una alanina o cisteína en la posición 190 de NEP2. Cambio de aminoácido desde (A) alanina (A190) en *M. laxa* 8l y *M. fructigena* Mgena6 a (B) cisteína (C190) en *M. fructicola* 38C.

Además, llevamos a cabo la modelización de posibles homodímeros y heterodímeros utilizando subunidades pertenecientes a diferentes especies de *Monilinia*, y homopolímeros de tres a seis subunidades. Si bien tanto los homodímeros como los heterodímeros pueden formarse, los heterodímeros son mucho menos estables (datos no mostrados). Las mejores predicciones estructurales se obtuvieron con homotrímeros, que mostraron mayor estabilidad. Los oligómeros consistentes en cuatro o cinco subunidades fueron menos estables, mientras que los de seis subunidades fueron predichos como dos homotrímeros interactuando entre ellos (Figura 4.34, figura 4.35). No se observaron diferencias entre los homotrímeros de las tres especies de *Monilinia*, lo que sugiere que las variaciones en las secuencias de aminoácidos no afectan la formación ni la estabilidad de los oligómeros, independientemente del número de subunidades.

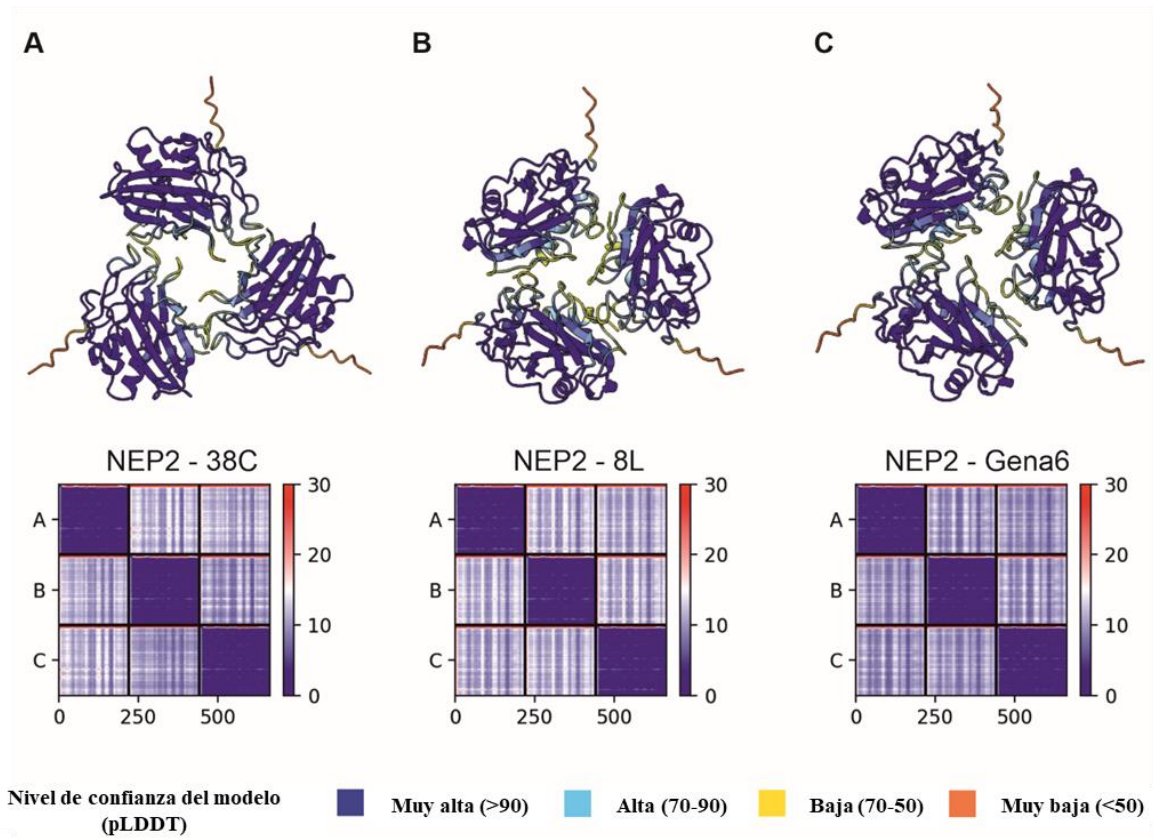


Figura 4.34. Conformación homotrimérica de NEP2 madura modelada por AlphaFold-Multimer para (A) *M. fructicola* 38C, (B) *M. laxa* 8L y (C) *M. fructigena* Mgena6. Los modelos NEP2 están codificados por colores según la puntuación de la prueba de diferencia de distancia local predicha (pLDDT). Diagramas de error de alineación predicho (PAE) que muestran las regiones de baja confianza (rojo) a alta confianza (azul) para cada estructura homotrimérica predicha.

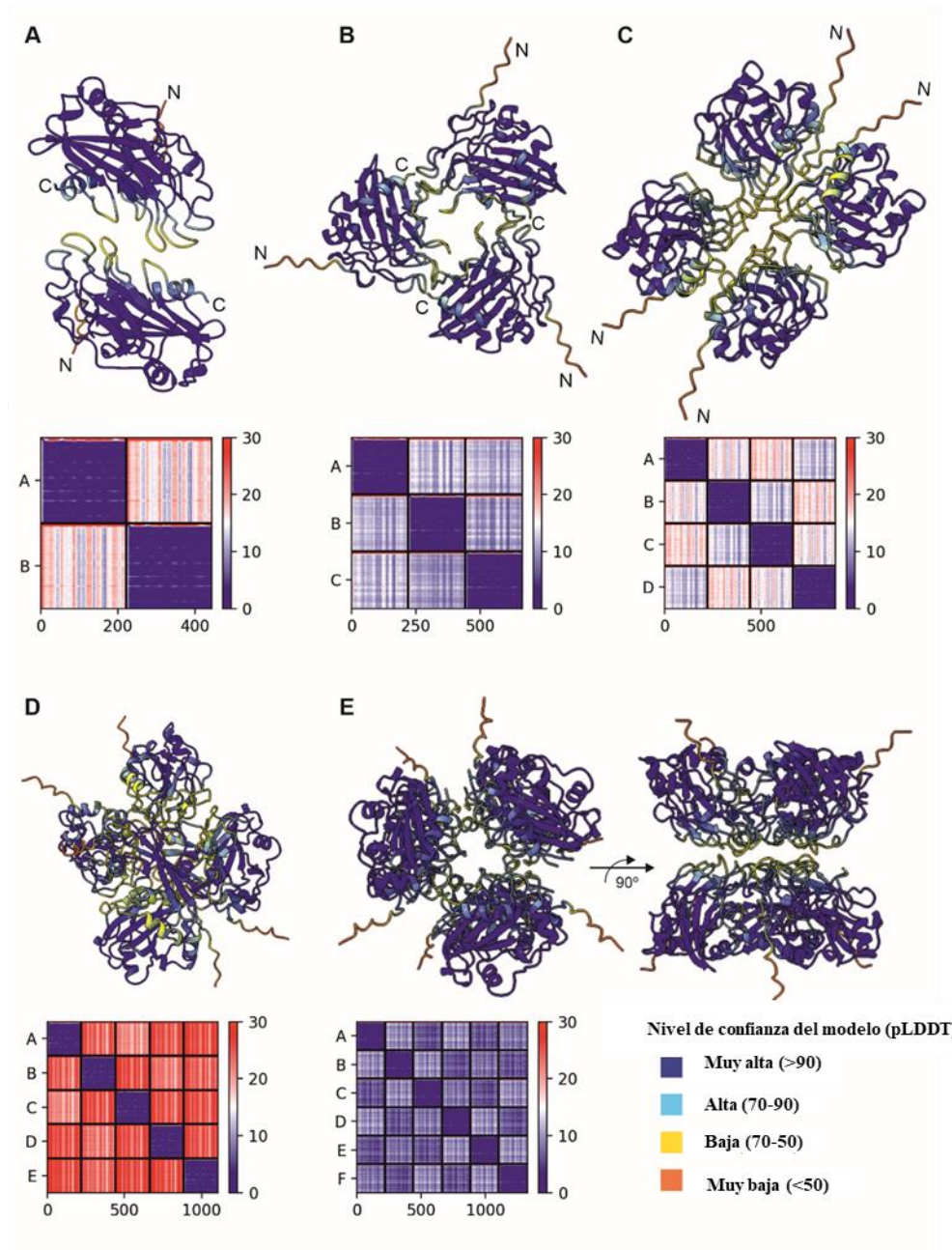


Figura 4.35. Estructura del oligómero maduro NEP2 de *Monilinia fructicola* predicha por AlphaFold-Multimer presente en la cepa 38C para una conformación (A) dimérica, (B) trimérica, (C) tetramérica, (D) pentamérica y (E) hexamérica. Los modelos NEP2 están codificados por colores según la puntuación de la prueba de diferencia de distancia local predicha (pLDDT). Los gráficos de error de alineación predicho (PAE) muestran las regiones de baja confianza (rojo) a alta confianza (azul) para cada estructura de oligómero predicha.

4.4.6. La luz roja causa sobreexpresión de *nep2* en *M. fructicola* 38C y *M. laxa* 8L

La luz roja influenció las primeras etapas de la etiología de la podredumbre parda y desempeñó un papel en la regulación de la transcripción de genes de CAZymes, por lo que también probamos si contribuía a la regulación de las NLPs. Para ello se usó el mismo enfoque experimental que en el apartado 4.4.4.

Para las tres especies, *nep2* mostró mayores niveles de expresión que *nep1*, y su regulación fue significativamente influenciada por la luz roja. La luz roja causó sobreexpresión de *Mfcnep2* en *M. fructicola* 38C, comenzando a las 2.5 hpi, manteniendo el mismo nivel de fotoinducción a las 5 hpi y alcanzando su máximo a las 14 hpi. En contraste, para *Mfcnep1* se observó un ligero aumento de expresión a las 2.5 hpi bajo luz roja (Figura 4.36).

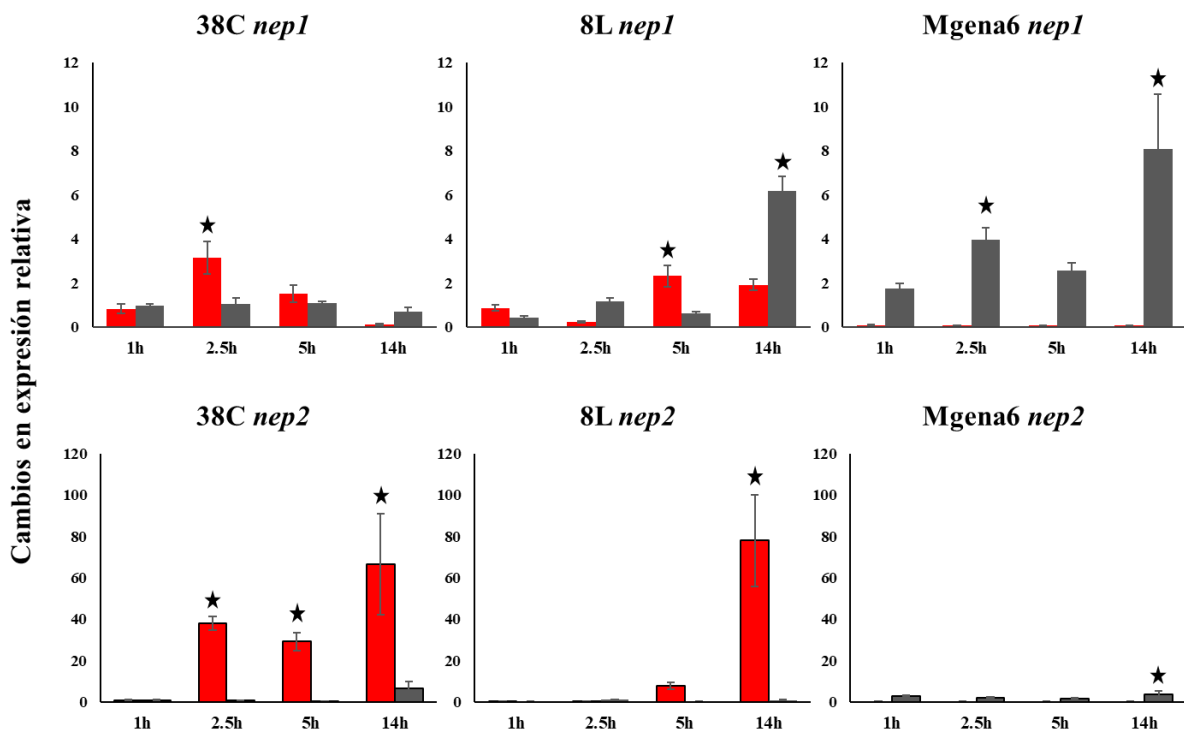


Figura 4.36. Cambios en la expresión génica relativa de los genes *nep1* y *nep2* en *M. fructicola* 38C, *M. laxa* 8L y *M. fructigena* Mgena6 inducidos por la luz roja representado usando los valores medios del FC, incluido el error estándar, de tres experimentos separados utilizando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Schmittgen y Livak, 2008). Se usó la histona H3 como gen de control endógeno. Las diferencias estadísticamente significativas según la prueba de Student-Newman-Keuls entre las muestras y el grupo de control están marcadas con una estrella.

La luz roja causó fotoinducción de *Mlnep2* y *Mlnep1* en *M. laxa* 8L, pero a un ritmo más lento que en *M. fructicola* 38C. *Mlnep2* fue fotoinducido a partir de las 14 hpi, mientras que *Mlnep1* mostró signos de fotoinducción a las 5 hpi, pero después de ese momento, los niveles de expresión en total oscuridad fueron mucho más altos que bajo luz roja (Figura 4.36). No encontramos fotoinducción por luz roja para ambos genes en *M. fructigena* *Mgena6*, aunque ambos genes experimentaron aumentos en sus niveles de expresión a lo largo del tiempo en oscuridad total (Figura 4.36).

A continuación, comparamos las regiones promotoras de ambos genes 1000 pb antes de comenzar el ORF entre las tres especies y analizamos los elementos regulatorios dependientes de la luz. El estado de conservación de la región promotora fue muy alto, al igual que el de la ORF (figuras 4.37 y 4.38). En el caso de *nep2*, encontramos en la región promotora de *M. fructicola* 38C y *M. laxa* 8L la estructura típica para la unión del WCC, denominada Elemento Regulador de Luz (LRE). Esta estructura tiene la siguiente secuencia consenso "GATNC-CGATN" y consiste en dos motivos GATN repetidos con un espaciado entre ellos que varía en longitud entre las especies, en la que N puede ser cualquier nucleótido, pero el mismo nucleótido se usa en ambas repeticiones (He & Liu, 2005). En *M. fructigena* *Mgena6* no pudimos identificar las dos partes de la secuencia consenso del LRE (figura 4.39).

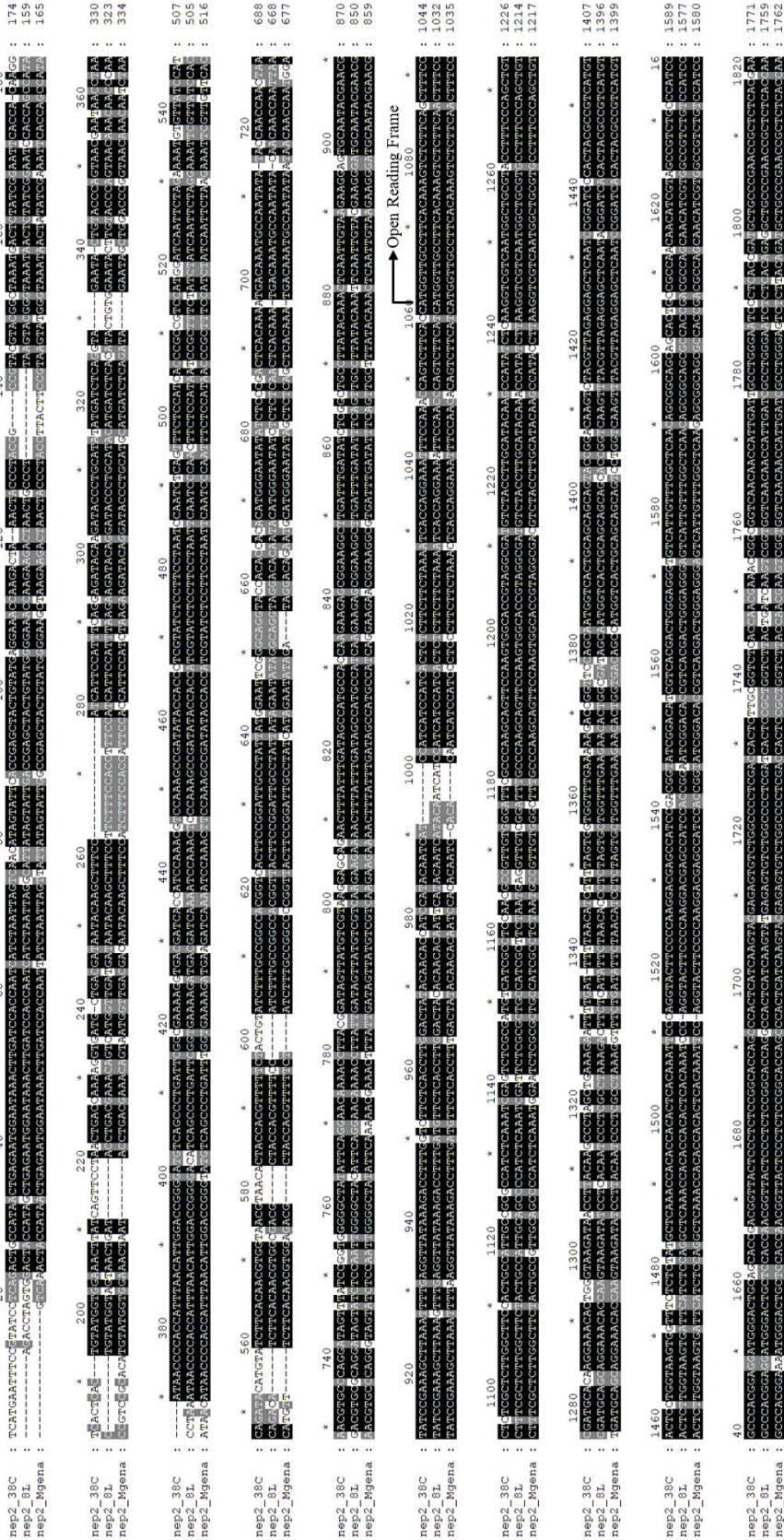


Figura 4.38. Alineamiento por pares de las regiones promotoras y ORFs de *nep2* en *M. fructicola* 38C, *M. laxa* 8L y *M. fructigena* Mgena6.

También encontramos sitios de unión relacionados con activadores del desarrollo y diferenciación de esporas (*abaA*) en las regiones promotoras de *nep1* y *nep2* en las tres especies, siempre a aproximadamente -950 pb desde el inicio de la transcripción. Además, encontramos sitios de unión de activadores de genes implicados en la biosíntesis de proteínas (*GCN4*) y múltiples cajas GATA y TATA en las regiones promotoras de ambos genes. En el promotor de *nep1*, encontramos tres sitios de unión para el factor de transcripción de pH ambiental PacC en las tres especies de *Monilinia* en una región muy conservada, lo que sugiere una regulación por pH para este gen (figura 4.39).

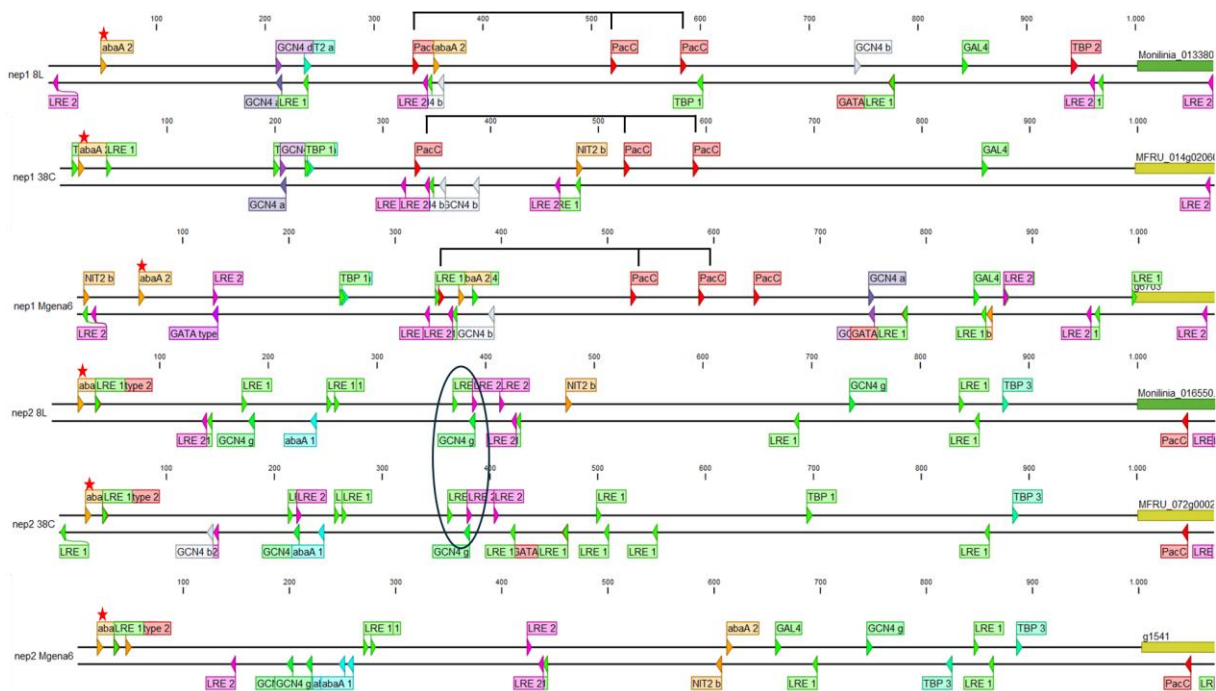


Figura 4.39. Posibles dianas de unión de factores transcripcionales en las regiones promotoras de *nep1* y *nep2* de los aislados *M. fructicola* 38C, *M. laxa* 8L y *M. fructigena* Mgena6. Se resalta la repetición de tres sitios de unión a PacC en los tres aislados. Los elementos de unión al WCC encontrados en los promotores de *nep2* de *M. fructicola* 38C y *M. laxa* 8L están rodeados.

5. Discusión

La luz incide sobre el desarrollo de la podredumbre parda del melocotón tanto en el periodo de precosecha de la fruta (la radiación solar) como en la cadena de postcosecha (la iluminación artificial). La cantidad y cualidad de la luz juega un papel regulatorio en el desarrollo de la enfermedad, donde las distintas especies de *Monilinia* responden al estímulo luz de forma diferente en cuanto a crecimiento y capacidad de infección, a pesar de que todas cuentan en sus genomas con la misma batería de genes codificantes de fotorreceptores y de CAZymes, además de dos NEP1-like.

Estudiar cuál es el efecto de la luz en el proceso de patogénesis de *Monilinia* spp. es de vital importancia a la hora de conocer el desarrollo de la enfermedad y diseñar estrategias eficaces de control, tanto en precosecha como postcosecha. Por lo tanto, esta tesis profundiza y amplía el conocimiento disponible sobre la interacción entre patógeno-huésped-ambiente, específicamente *Monilinia*-nectarina-luz, y su papel en la regulación de los factores de virulencia. Aquellos de los que se sirve *Monilinia* spp. para vencer las defensas de la planta, y determinar si existen diferencias entre las distintas especies causantes de podredumbre parda. Tradicionalmente se han estudiado la temperatura y la humedad relativa como los factores ambientales de mayor peso sobre el desarrollo de la podredumbre parda en melocotón (Casals et al., 2010; Garcia-Benitez et al., 2017b; Gell et al., 2009). Sin embargo, en los últimos años se han hecho grandes avances en el campo de la fotobiología y nuestra comprensión sobre cómo la luz puede determinar el éxito o fracaso de un proceso infectivo ha aumentado considerablemente. La luz afecta a la virulencia y el desarrollo de hongos patógenos al activar fotoreceptores específicos que, mediante la interacción con familias de proteínas reguladoras como las proteínas VELVET, regulan su crecimiento, esporulación y producción de toxinas clave durante la infección, especialmente bajo ciertas longitudes de onda como la luz azul (Cerón-Bustamante et al., 2023; Roden & Ingle, 2009; Schumacher et al., 2012).

Monilinia spp. es capaz de detectar cambios en la cantidad y cualidad de la luz, que provocan diferencias en su crecimiento y esporulación en medio de cultivo a nivel de especie y aislado, bajo luces fluorescentes. Otros autores también han observado la plasticidad fenotípica de las tres especies de *Monilinia* en medio de cultivo y bajo luces LEDs (Verde-Yañez et al. 2022; Balsells-Llauradó et al., 2021), especialmente en cuanto a la morfología de las colonias. La luz fluorescente blanca

reduce el crecimiento y la esporulación de las colonias del aislado 38C de *M. fructicola* y de *M. fructigena* Mgena6, mientras que no tiene ningún efecto sobre el aislado 1C de *M. fructicola*. Rodríguez-Pires et al. (2021b) y Verde-Yañez et al. (2022) tampoco detectaron ningún efecto de la luz blanca sobre el crecimiento de distintos aislados de *M. laxa* en medio de cultivo, aunque todos ellos aumentaban su esporulación.

La luz roja fluorescente fue la única condición de iluminación que produjo de forma significativa un aumento en la tasa de crecimiento diario de *M. fructicola* 38C y una reducción en la esporulación al compararse con el control en oscuridad, mientras que *M. fructigena* Mgena6 mostraba una reducción de la velocidad de crecimiento en el fotoperiodo de 8 h de iluminación y ningún tipo de esporulación al igual que en oscuridad. El resto de las longitudes de onda no afectaron al crecimiento o tuvieron un efecto negativo en *M. fructicola* 38C y *M. fructigena* Mgena6. Este efecto positivo de la luz fluorescente roja en la tasa de crecimiento se ha observado en tres aislados de *M. laxa*, incluido 8L. La luz verde, la luz diurna y la oscuridad también aumentaron la tasa de crecimiento de los aislados aunque en menor medida, mientras la luz azul impidió totalmente el crecimiento del hongo (Rodríguez-Pires et al., 2021b). Sin embargo, la esporulación de *M. laxa* en medio de cultivo fue mayor con más horas de exposición a luz blanca, luz negra, luz verde, respecto a la oscuridad o luz roja, que fueron significativamente menores (Rodríguez-Pires et al., 2021b).

El efecto que pueden tener las luces monocromáticas en el desarrollo de los hongos filamentosos está bien documentado. La luz azul tiene un efecto negativo en el desarrollo *in vitro* de hongos filamentosos (De Lucca et al., 2012; Trzaska et al., 2017), reduciendo el crecimiento en *B. cinerea* (Xu et al., 2017), y reprimiendo la conidiación en *B. cinerea* y *Penicillium digitatum* (Liao et al., 2013; Rasiukevičiūtė et al., 2021). En 2021, Rasiukevičiūtė et al. mostraron cómo diferentes longitudes de onda y fotoperiodos afectaban las características morfológicas y fenotípicas de *B. cinerea*. Otros autores han descrito que la luz verde (alrededor de 540 nm) reprime el crecimiento micelial deformando mitocondrias y vacuolas en *B. cinerea* (Zhu et al., 2013), mientras que la luz azul (alrededor de 450 nm) y roja (alrededor de 650 nm) frenan la formación de conidias (Tan, 1975). La luz roja aumenta los niveles de esporulación en *Alternaria alternata* (Igbalajobi et al., 2019), mientras la luz azul actúa como agente antimicrobiano (Kahramanoğlu et al., 2020). Luces de color negro (ultravioleta cercano), azul y rojo lejano promueven la formación de hifas infectivas en *B. cinerea*, mientras que la luz roja las reprime, resultando en

un gran número de tubos germinativos que no llegan a desarrollar infección (Islam & Honda, 1998). Existen casos de aislados “ciegos” de *B. cinerea* que presentan una reducción en sus niveles de virulencia como consecuencia de un truncamiento en el gen *bcvel1* (Schumacher et al., 2012). También, un tratamiento de luz azul emitida por LEDs es capaz de reducir la capacidad infectiva de *Penicillium digitatum* (Lafuente et al., 2018). En ambos casos, los autores relacionan la reducción en virulencia y capacidad infectiva de los hongos con una morfología conidial alterada. Balsells-Llauradó et al. (2021) demostraron que los tratamientos con luz visible de intensidad variable alteran la morfología y viabilidad de las conidias de *M. laxa*.

La luz también afecta al desarrollo de la podredumbre parda, acelerando significativamente la infección causada por *M. fructicola*. Nectarinas incubadas durante 38h (24h en oscuridad y 14h bajo luz roja o azul fluorescente) presentan maceración de los tejidos en las fases iniciales del desarrollo de la podredumbre parda causada por *M. fructicola*. Sin embargo, si las nectarinas se incuban siempre en la oscuridad, los primeros síntomas de infección por parte de *M. fructicola* se hacen visibles en las 48 a 72 horas tras la inoculación (García-Benitez et al., 2016), 10 a 34 horas más tarde que en condiciones de iluminación con luz roja o azul. No se detectaron síntomas a 38h de incubación en nectarinas bajo ninguna otra luz ni en el control de oscuridad, y tampoco se apreció la aparición de síntomas con *M. laxa* 8L y *M. fructigena* Mgena6. En un trabajo realizado por Villarino et al. (2016), donde utilizaron 20 aislados de cada una de las tres especies de *Monilinia*, *M. fructicola* causaba siempre mayores lesiones, con un menor periodo de incubación y periodo de latencia que las otras dos especies. *M. fructicola* siempre tendrá por tanto una ventaja añadida en infecciones tempranas. El efecto de la luz sobre el desarrollo de la podredumbre parda en nectarinas es diferente con tiempos prolongados de incubación. Así, la luz roja fluorescente también incrementa la podredumbre causada por distintos aislados de *M. laxa* sobre nectarinas tras 7 días de incubación (Rodríguez-Pires et al., 2021a).

Sin embargo, parece que la respuesta a luz de *Monilinia* spp. no solo depende de las especies o el aislado, sino de la fuente de luz en sí misma. En un estudio reciente, Verde-Yáñez et al. (2022), usando las mismas especies y aislados, el mismo fotoperiodo y las mismas longitudes de onda, solo que generadas usando LEDs en lugar de tubos fluorescentes, describieron una respuesta a luz distinta. Verde-Yáñez et al. (2022) no observaron ningún efecto de las luces LEDs rojas sobre el crecimiento de ninguna de las especies de *Monilinia*, mientras que sí

encontraron un efecto inductor de las luces roja, azul, y blanca de alta intensidad sobre *M. fructicola*, que reduce su periodo de incubación y latencia respecto a la oscuridad (Balsells-Llauradó et al., 2021; Verde-Yáñez et al., 2022). Dichas diferencias pueden deberse a que la luz generada por LEDs y tubos fluorescentes no presenta las mismas características de composición. Mientras que las luces de color de LED emiten luz sólo a una longitud de onda determinada (p. ej. 660 nm en el caso la luz roja, Verde-Yáñez et al., 2022), los tubos fluorescentes emiten luz en un rango del espectro electromagnético (Rodríguez-Pires et al., 2021b), siendo esta luz más intensa a determinadas longitudes de onda. Además, la composición espectral de la luz blanca generada por los tubos fluorescentes usados durante estos estudios es pobre en longitudes de onda superiores a 600 nm, correspondientes a la luz roja en adelante. Esto podría indicar que *Monilinia* spp. tiene una maquinaria fotorreceptora muy sensible, capaz de detectar diferencias en las cualidades de la luz a la que es expuesta, y reaccionar en consecuencia, siendo dicha respuesta variable para cada especie.

El tiempo de incubación y también el tipo de inóculo utilizado para infectar los frutos puede incidir sobre el desarrollo de la podredumbre parda en el caso de *M. fructigena* Mgena6. Ha resultado imposible producir conidias de *M. fructigena* Mgena6 en condiciones de esterilidad. Esto nos obligó a utilizar micelio, obtenido de la parte con crecimiento más activo de la colonia, para la infección de los frutos. Aunque Verde-Yáñez et al. (2022) utilizando el mismo tipo de inóculo para *M. fructigena* y un periodo de incubación de las nectarinas de 7 días, si observaron síntomas y diferencias en los periodos de incubación y latencia de los frutos incubados bajo luz frente a los de oscuridad. *M. fructigena* ha sido descrita como la especie menos virulenta sobre fruta de hueso (Villarino et al., 2016). Estos resultados sugieren que la luz, y en concreto las longitudes de onda correspondientes a la luz roja, también afectan al desarrollo de la podredumbre parda en nectarinas en periodos largos de tiempo (Balsells-Llauradó et al., 2021; Rodríguez-Pires et al., 2021a; Verde-Yáñez et al., 2022).

El patosistema *Monilinia* – nectarina no es el único en el que se han reportado efectos de la luz en el desarrollo de la enfermedad. Una mayor irradiancia es capaz de aumentar la gravedad de la enfermedad causada por *M. laxa* sobre cerezas, viéndose disminuidos los tiempos de incubación y latencia (Rodríguez-Pires et al., 2021a). Alta intensidad luminosa (185,45 W/m²), similar a la del sol durante el mes de Julio, causó una mayor severidad de la podredumbre causada por *M. laxa* en todos los cultivares de cerezo, tanto en las variedades tempranas como en las

tardías, que la baja irradiancia (145,85 W/m²), similar a la luz de Mayo (Rodríguez-Pires et al., 2021a).

La presencia, o ausencia, de luz puede proporcionar a los hongos necrotrofos como *Monilinia* spp. información acerca de su entorno, que usan para adaptarse a cambios en el ambiente, asegurar su supervivencia, planificar su reproducción y asegurar el proceso de infección (Schumacher 2017). *Monilinia* spp. necesita sobrevivir los meses de invierno sin su huésped, por lo que un correcto reconocimiento de las condiciones ambientales de su entorno resulta crucial para determinar si puede reanudar su ciclo vital. Además, los patógenos vegetales se encuentran con un perfil lumínico alterado, rico en longitudes de onda verdes e infrarrojas y pobre en luz azul y roja lejana, como consecuencia de la absorción e irradiación de luz por parte de las células vegetales en su búsqueda de las mejores condiciones en las que realizar la fotosíntesis, (Idnurm & Crosson, 2009; Roden & Ingle, 2009), por lo que un correcto reconocimiento de las longitudes de onda a las que está expuesta resulta doblemente importante para *Monilinia* spp. Nuestros resultados sugieren que el reconocimiento de la luz roja juega un papel de importancia en el desarrollo de la podredumbre parda durante los primeros momentos de la infección, y de nuevo observamos una diferencia significativa entre las principales especies causantes de esta enfermedad, siendo *M. fructicola* la que se ve más beneficiada tras una exposición a estas longitudes de onda, lo cual podría suponer una ventaja evolutiva relacionada con su mayor nivel de virulencia.

Las grandes diferencias encontradas en el crecimiento y capacidad de infección de la fruta a distintas luces y entre las distintas especies de *Monilinia* causantes de podredumbre parda podrían ser debidas a diferencias en la maquinaria proteica encargada del proceso de fotorrecepción, o a diferencias a nivel de regulación transcripcional de los genes fotorreceptores y sus genes diana o efectores que han de gestionar la respuesta a cada tipo de luz. *M. fructicola*, *M. fructigena* y *M. laxa* poseen una batería de fotorreceptores idéntica, y muy similar a la de *B. cinerea* (Schumacher, 2017), perteneciente a la familia *Sclerotinaceae*. La identificación de la batería de fotorreceptores se ha realizado gracias a la disponibilidad de las secuencias genómicas de las tres especies de *Monilinia* estudiadas en esta tesis, y a estudios previos realizados en el organismo modelo *B. cinerea* y en *M. laxa* (Rodríguez-Pires et al., 2021b). Esta batería de fotorreceptores es una de las más completas dentro de la división *Ascomycota*, y les permite reconocer longitudes de onda entre 350 y 780 nm (Corrochano, 2019; Schumacher, 2017), lo cual nos indica la gran relevancia que tiene el proceso de fotorrecepción para estos hongos

fitopatógenos. Además, la presencia de tres posibles fotorreceptores para luz roja de nuevo nos indica la relativa importancia que estas longitudes de onda pueden tener para *Monilinia* spp., ya que otros hongos fitopatógenos de la división *Ascomycota*, como *Fusarium oxysporum*, *Magnaporthe oryzae* o *Colletotrichum graminicola* solo cuentan en su genoma con información para uno o dos de estos fitocromos (Corrochano, 2019; Schumacher, 2017).

Al no encontrar diferencias entre especies en la maquinaria fotorreceptora de *Monilinia* spp., el siguiente paso fue realizar un análisis transcriptómico para medir la respuesta frente a luz de cada especie en busca de una explicación para el comportamiento diferencial previamente observado. Rodríguez-Pires et al. (2021b) ya describió la respuesta de varios aislados de *M. laxa* frente a luz blanca y de varios colores. Los autores encontraron que existe una fotoinducción por luz blanca de los genes *Mlvel2*, *Mlphy2*, *Mlops2* y *Mlcry2*, y una inducción por luces de colores de los genes *Mlvel1*, *Mlvel4*, *Mlphy1* y *Mlcry1*, sugiriendo sistemas reguladores transcripcionales dedicados a modular el desarrollo y la dispersión de este patógeno. *M. fructicola* sigue un patrón transcripcional de respuesta frente a luz similar a *M. laxa*, aunque con ligeras modificaciones, mientras que *M. fructigena* se comporta de forma totalmente diferente. Usando la misma fuente de luz blanca que en el estudio por parte de Rodríguez-Pires et al. (2021b), *M. fructicola* 38C muestra fotoinducción en los genes *Mfcry1*, *Mfccry2*, *Mfcphy2*, *Mfcop2* y *Mfcvvd1* al crecer en medio sintético PDB, y tan sólo en *Mfcvvd1* al crecer sobre nectarina. *Mfcvvd1* es el gen que muestra mayor nivel de fotoinducción en ambas condiciones de crecimiento. Sin embargo, *Mlvvd1* no fue incluido en el estudio de Rodríguez-Pires et al. (2021b), a pesar de estar presente en el genoma de *M. laxa*. El resto de los genes implicados en el proceso de fotorrecepción de *M. fructicola* no mostraron señales de modificar su actividad transcripcional en respuesta al estímulo por luz blanca, ni se encontró enriquecimiento en términos GO relacionados con el proceso de fotorrecepción en los DEGs de *M. fructicola* 38C.

El gen *vvd1* codifica para un fotorreceptor de luz azul perteneciente al grupo LOV L2, y cumple una función de regulación antagonista del complejo White-Collar (WCC). Está reportado que la patogénesis de varios hongos fitopatógenos, como *Cercospora zea-maydis* (Ridenour & Bluhm, 2019) o *B. cinerea* (Canessa et al., 2013), depende del WCC. El WCC, compuesto por los fotorreceptores WCL1 y WCL2, opera como un factor de transcripción activado por luz azul (Ballario et al., 1996; Linden & Macino, 1997), y sin embargo ninguno de sus componentes mostró fotoactivación en sus niveles transcripcionales en *M. fructicola* 38C por efecto de

la luz blanca, ni tampoco en *M. laxa* 8L (Rodríguez-Pires et al. 2021b). Estos resultados indican que el mecanismo de activación del WCC está regulado totalmente por modificación postraduccional mediada por la activación del cromóforo en *Monilinia*. Por lo tanto, debe existir un mecanismo regulador que controle la actividad del WCC una vez activo. La proteína VVD1 participa en el proceso de fotoadaptación en *Neurospora crassa* (Schwerdtfeger & Linden, 2003). La luz activa la transcripción de *vvd1*, propiciando la formación de heterodímeros de VVD1 y WCL1, interfiriendo en la formación del WCC, de forma que, con el paso del tiempo bajo iluminación, los niveles de ARN producidos por la inducción positiva del WCC regresan a los niveles de oscuridad (Corrochano et al., 2019). En el caso de *M. fructigena* Mgena6, nuestros resultados indican que *Mfgvvd1* está sujeto a una fuerte fotoinducción por luz blanca a 5 min y, al contrario que 38C, mantiene sus niveles de activación tras 14 h de estímulo. En esta tesis proponemos que VVD1 puede participar en el proceso de fotoadaptación en *Monilinia* spp realizando una función como regulador negativo como se ha descrito previamente. A parte de *Mfgvvd1*, *Mfgfrq1* fue el único transcrito cuya función está relacionada con los procesos de fotorrecepción que presenta niveles de fotoinducción significativos en *M. fructigena*. La función de FRQ1 consiste en regular un reloj circadiano en conjunto con el WCC, y está relacionada con la patogénesis de *C. zea-maydis* y *B. cinerea* (Hevia et al., 2015, 2016; Ridenour & Bluhm, 2018). La expresión de genes fotorreceptores de *M. fructigena* Mgena6 es, de nuevo, diferente al de *M. fructicola* 38C, lo cual indica que ambas especies cuentan con una estrategia distinta en fotorrecepción, regulación y adaptación.

La producción de conidias en colonias de *M. fructicola* y *M. laxa* depende de la cantidad de luz recibida durante el tiempo de incubación, mientras que *M. fructigena* no esporula ni en luz ni en oscuridad. Sin embargo, la luz no tuvo ningún efecto en la expresión génica de las proteínas *VELVET* en *M. fructicola* 38C, a pesar de que este aislado presentó serias dificultades para producir conidias al ser expuesto a fotoperiodos de luz blanca, al contrario que *M. fructicola* 1C. La familia de proteínas *VELVET* está involucrada en la regulación de los procesos de conidiación. El proceso de regulación entre reproducción sexual y asexual en *B. cinerea* también está regulado por la presencia o ausencia de luz. Se han encontrado aislados salvajes de *B. cinerea* con mutaciones en la proteína BcVEL1, resultando en un fenotipo “ciego”, de “*always conidia*” independientemente de las condiciones de iluminación, a causa de una regulación anómala de los procesos de conidiación. Este fenotipo está además asociado con una virulencia reducida

(Schumacher et al., 2012). Este fenotipo de “*always conidia*” también se ha descrito en mutantes de *Aspergillus nidulans* que tienen la mutación *veA1*, resultando en una proteína truncada que no es capaz de migrar desde el citoplasma al núcleo en ausencia de luz y promueve el desarrollo de estructuras de reproducción asexual y modula el ciclo reproductivo sexual (Stinnett et al., 2007). El fenotipo hiperesporulante causado por la mutación *veA1* ha sido ampliamente utilizado por todos los laboratorios dado que permite la obtención de conidias en la oscuridad de un incubador (Mooney & Yager, 1990).

Por otro lado, hemos podido describir *Mfcfar1*, un gen codificante para una pequeña proteína de 82 aminoácidos sin función definida y carente de dominios conservados. *Mfcfar1* muestra una fotoinducción por luz blanca alta y constante. Este gen está significativamente inducido por luz blanca tanto *in vitro* como en tejido vegetal infectado por *M. fructicola* 38C. *far1* se encuentra presente en el genoma de las tres principales especies de *Monilinia* causantes de podredumbre parda en España, así como en muchos organismos dentro de la subdivisión *Pezizomycotina*, en la que se encuentran incluidos bastantes géneros de hongos fitopatógenos, como *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Verticilium*, *Botrytis*, y *Sclerotinia* spp. Aunque FAR1 carece de función conocida, la búsqueda en la base de datos UniProt (Bateman et al., 2023) usando la secuencia aminoacídica de FAR1 perteneciente a *M. fructicola* 38C otorga como resultado una anotación automática correspondiente a “*Conidiation-specific protein 8*”, del aislado *M. fructicola* Mfrc123. Este gen, originalmente caracterizado en *N. crassa* como *con-8*, se expresa de forma temprana durante la producción de conidias, aunque no lo hace en respuesta a estímulos de luz azul (Lauter & Russo, 1991; Roberts & Yanofsky, 1989). Por lo tanto, existe la posibilidad de que *far1* esté involucrado en el proceso de conidiación de *M. fructicola* 38C, por lo que su correcta caracterización podría ayudar a explicar el patrón de conidiación de este aislado y la posible función de la luz en el mismo.

Los resultados del análisis transcripcional de las muestras de tejido de fruta infectado por *M. fructicola* 38C y *M. fructigena* Mgena6 también demuestran que la respuesta y regulación frente a luz de las dos especies es distinta. En ambas ocasiones se obtiene un número similar de DEGs, que es también similar al número de DEGs observado en *B. cinerea* (Pérez-Lara et al., 2023). Sin embargo, el enriquecimiento en términos GO de ambas especies fue distinto, señalando un proceso regulatorio diferente para el mismo estímulo. En el caso de *M. fructigena* Mgena6, los DEGs encontrados están muy enriquecidos en términos GO relacionados con el metabolismo de carbohidratos en el espacio extracelular,

posiblemente CAZymes que pudieran afectar al desarrollo de la enfermedad por parte de Mgena6 al tratarse de conocidos factores de virulencia en *Monilinia* spp. (García-Benítez et al., 2019). Al analizar más a fondo qué genes son los que se están inducidos o reprimidos por luz en Mgena6, encontramos que hay una gran cantidad de genes codificantes para CAZymes que se ven inducidos por luz blanca tras 5 minutos de iluminación pero que, tras 14 horas de estímulo, se encuentran reprimidos, en lo que suponemos puede ser un proceso de fotoadaptación dependiente de VVD1. En *M. fructigena* Mgena6 los niveles de expresión de *Mfgvvd1* son continuos, por lo que es muy probable que conduzcan a un mantenimiento de la proteína en la célula independiente de luz, resultando en una acción negativa mantenida sobre la actividad del WCC, reduciendo así la expresión de aquellos genes dependientes de la actividad WCC. En *M. fructicola* 38C, no hay un enriquecimiento tan evidente de términos GO relacionados con la actividad de las CAZymes en los DEGs encontrados gracias al estímulo por luz blanca. Sin embargo, hemos demostrado que luces de color rojo y azul aceleran la aparición de los síntomas de la enfermedad causada por *M. fructicola* 38C al reducir el periodo de latencia, a la par que se induce la actividad transcripcional de un grupo de CAZymes y de la proteína NEP2. Esto nos permite suponer que *M. fructicola* aprovecha todas las horas del día para infectar y colonizar, además de la oscuridad, en especial las horas del día en las que la luz que alcanza al hongo es más rica en estas dos longitudes de onda, mientras que las horas óptimas de desarrollo de *M. fructigena* son sólo las nocturnas. Esto puede deberse a que *M. fructigena*, en condiciones de iluminación diurna, no destine recursos al desarrollo de síntomas, sino a protegerse del estrés causado por la luz, mientras que durante la noche sí que emplea sus recursos y energía en el proceso infectivo.

Existen diferencias en el número de CAZymes codificadas en el genoma de las tres especies de *Monilinia*, así como variaciones en el número de CAZymes incluidas en cada familia de estas. Se identificaron un total de 414, 398 y 383 CAZymes en los genomas de *M. fructicola* 38C, *M. laxa* 8L y *M. fructigena* Mgena6, respectivamente. Estos números suponen un 3,96%, 4,15% y 4% del total de proteínas predichas para cada especie. Estos números de CAZymes están de acuerdo con las estimaciones realizadas por Marcet-Houben et al. (2021) (en torno al 4% en las tres especies) y muy cercanas a las propuestas por Rodríguez-Pires et al. (2020a, 2020b) para *M. laxa* (403 CAZymes), y las de Amselem et al. (2011) para *B. cinerea* (367) y *Sclerotinia sclerotiorum* (346). Algunos estudios han señalado que las CAZymes como factores de virulencia en *B. cinerea* y *S.*

sclerotiorum puesto que se dirigen a los principales componentes de la pared celular de la planta (Blanco-Ulate et al., 2014; Kubicek et al., 2014).

En los tres CAZomes de las tres especies de *Monilinia* encontramos representantes de todas las familias de CAZymes, siendo las glicosilhidrosilasas las más abundantes en los genomas de *M. laxa*, *M. fructicola* y *M. fructigena*, seguidas por las GTs. La mayoría de las proteínas de la familia GH28 son poligalacturonasas, aunque algunas de ellas hidrolizan el ramnogalacturonano, que forma una parte ramificada del complejo de pectina (Marcet-Houben et al., 2021). Los hongos necrotrofos y los biotrofos tienen genomas más grandes que los no patógenos, sin embargo, sólo los necrotrofos poseen más enzimas GH28 que los no patógenos (Sprockett et al., 2011). Por lo tanto, la expansión de GH28 es el resultado tanto de la variación en el tamaño del genoma de las especies fúngicas como de la selección diversificadora dentro de los hongos patógenos necrotrofos de las plantas. Es probable que la evolución de GH28 entre los necrotrofos haya sido impulsada en una carrera coevolutiva con las plantas (Sprockett et al., 2011).

En el genoma de las tres especies de *Monilinia* se localizan los dos genes codificantes para proteínas NEP1-like, *nep1* y *nep2*. El número de copias de genes de NLPs presentes en el genoma varía enormemente, desde 50 en *Oomycetes* (Bae et al., 2005) hasta entre 1 y 6 en *Dothideomycetes* (Dal'Sasso et al., 2023). El modo de acción de las NLPs consiste en la formación de poros temporales en la membrana plasmática de las células vegetales, siendo esta superfamilia de proteínas la única conocida con tal actividad (Seidl & Van Den Ackerveken, 2019). La estructura primaria de las NLPs está muy conservada entre las especies de *Monilinia*, pero no es idéntica. Se observaron cambios que resultan en sustituciones aminoacídicas neutrales para la estructura terciaria de la proteína. *M. fructicola* 38C es la especie que más cambios acumula. La alanina en la posición 190 en *M. laxa* 8L y *M. fructigena* Mgena6 está sustituida por una cisteína, resultando en un cambio de un aminoácido no polar a uno polar. Nuestros resultados de modelado predicen estructuras muy parecidas y que la cavidad cargada negativamente encargada de reconocer el GIPC está bien conservada en *M. laxa*, *M. fructicola* y *M. fructigena*, por lo que el modo de acción estaría también conservado. Además, dado que se presupone que ha de existir polimerización para la formación del poro, nuestros modelos predicen que, al menos, una formación trimétrica es la más estable para oligómeros de cada una de las tres especies, en contraste a los modelos diméricos propuestos por de Oliveira et al. (2012) para *MpNep2* de *Moniliophthora perniciosa*. Además, esta conformación en

homotrimeros propuesta para *Monilinia* induce un cambio conformacional en la proteína, tal y como ocurre en otras proteínas formadoras de poros similares, como las actinoporinas (Peraro & Van Der Goot, 2016). Los posibles puntos de interacción entre monómeros están bien conservados entre las especies de *Monilinia*. Aunque hay bastantes cambios específicos alrededor de estas zonas, nuestros modelos muestran que se pueden formar dímeros interespecíficos, sin embargo, su formación parece ser menos estable que la de monómeros de la misma especie, lo que sugiere que la coinfección de varias especies de *Monilinia* probablemente no se vea favorecida por la actividad de las NLPs.

Las luces roja y azul aceleran la aparición de síntomas en los primeros momentos del desarrollo de la enfermedad por parte de *M. fructicola* 38C, lo cual parece indicar que existen diferencias a nivel regulatorio del proceso de infección desencadenadas por estas longitudes de onda. A su vez, la luz roja y azul modifican la actividad transcripcional en *M. fructicola* de un grupo de CWDEs y *Mfcnep2*. Este grupo de genes codificantes para CWDEs incluye las carbohidrato estererasas (CEs) *Mfcpme3*, *Mfcpme2* y *Mfcut1*, las glicósido hidrolasas (GHs) *Mfcpg1* y *Mfcell1*, y las polisacárido liasas (PLs) *Mfcpnl1* y *Mfcpnl2*. Estos genes podrían jugar un papel fundamental en la patogénesis de *Monilinia* spp. al aumentar la capacidad del hongo de penetrar el exocarpio del fruto, acelerando el proceso de infección temprana en función de las condiciones de luz. No todas las formas de los factores virulencia se sobreexpresan en etapas tempranas de la infección, tal y como se ha demostrado para *B. cinerea*, donde entre todos los PGs sólo BcPG2 demostró ser un factor de virulencia (Kars et al., 2005). Nuestros resultados indican que existen diferencias significativas en la fotoinducción de estos nueve genes observada entre las tres especies. De los ocho genes del grupo de CWDEs testados, seis (*Mfcpnl1*, *Mfcpnl2*, *Mfcpme2*, *Mfcpme3*, *Mfcpg1* y *Mfcell1*) mostraron signos de fotoinducción en *M. fructicola* 38C, tan sólo 3 (*Mlpln2*, *Mlpme2* y *Mlpg1*) lo hicieron en *M. laxa* 8L. *M. fructigena* Mgena6 siguió un patrón transcripcional totalmente distinto, por el cual sólo *Mfgpnl2* mostró signos de fotoinducción por luz roja tras 2,5 h de irradiación para luego reprimirse a las 14 h, mientras que los genes *Mfgcell1* y *Mfgcut1* aumentaron su actividad transcripcional de forma significativa en condiciones de oscuridad. MIPG1, MIPME3, NEP-like o proteínas endoglucanasas han sido descritas como marcadores de virulencia entre distintos aislados de *M. laxa*, incluyendo también otros dependientes del tiempo como cutinasas, liasas y proteasas ácidas (Rodríguez-Pires et al., 2020). También en *B. cinerea*, *BcPME2*, gen homólogo a

pme2, junto al gen homólogo de *pg1*, *BcPG1*, son de las CAZymes más expresadas por el hongo al infectar tejido de distintos huéspedes (Blanco-Ulate et al., 2014).

Las PME's, pertenecientes a la subfamilia CE8, desempeñan un papel importante en la desesterificación de la pectina en metanol y ácido poligalacturónico, permitiendo la posterior acción de las otras enzimas despolimerizadoras, como PGs y PLs, que completan la degradación de las pectinas (Reignault et al., 2008; Valette-Collet et al., 2003). *Bcpme1* y *Bcpme2* se han descrito como genes indispensables en la virulencia de *B. cinerea* (Valette-Collet et al., 2003; Kars et al., 2005). Sin embargo, apenas se sabía casi nada sobre su contribución en la patogénesis de *Monilinia* spp. Baró-Montel y colaboradores (2019) demostraron que el gen *Mlpme2* es un factor de virulencia de *M. laxa*, que depende de la presencia de pectina en el medio para su expresión, y que MIPME2 y MIPME3 son clave para la degradación de la pared celular del huésped *in vivo* (Rodríguez-Pires et al., 2019). El gen homólogo en *B. cinerea*, BcPME2, también se encontraba entre los genes codificantes de CAZymes más expresados al infectar varios huéspedes (Blanco-Ulate et al., 2014).

Los niveles de expresión génica de las PME's de *M. fructicola* 38C al crecer sobre fruta, en medio sintético líquido PDB, o en agua suplementada con nectarina pulverizada (1% *nectarine*) son diferentes, sugiriendo que el hongo emplea unas enzimas u otras dependiendo del medio en el que se encuentra. Este resultado concuerda con la bibliografía existente, ya que *B. cinerea* emplea un set de CAZymes distinto en función huésped (Blanco-Ulate et al., 2014). Los genes *Mfcpme3* y *Mfcpme2* de *M. fructicola* sobre fruta sufren fotoinducción, mientras que en 1% nectarina solo sufre fotoinducción *Mfcpme3*, y ninguno de los dos se expresa de forma significativamente distinta al control oscuridad cuando *M. fructicola* crece en medio sintético PDB. La expresión génica de las PME's está regulada por pH (Pelloux et al., 2007), y en *M. laxa* el pH juega un papel regulatorio en la expresión y desempeño de estos genes (Baró-Montel et al., 2019). *M. fructicola* acidifica los tejidos del huésped durante la infección, sintetizando y segregando ácido glucónico (De Cal et al., 2013), lo cual activa la expresión de varias poligalacturonasas y podría activar la expresión de las PME's. Este comportamiento podría estar regulado por el factor de transcripción PacC, el cual está involucrado en la regulación de genes controlados por pH en hongos filamentosos (Peñalva et al., 2008). Los medios sintéticos pueden no ser susceptibles a los mecanismos que *M. fructicola* usa para acidificar tejidos, de modo

que un mecanismo que coordine la regulación por pH y la regulación por luz podría entrar en juego.

El gen *cut1* de *M. fructicola* sólo está fotoinducido por luz azul en PDB y en menor medida en 1% nectarina, mientras que durante la infección en fruta está reprimido por luz. Enzimas como cutinasas, presumiblemente necesarias para la penetración a través de la cutícula y otras enzimas hidrolíticas extracelulares implicadas en la degradación de la pared celular vegetal, o proteasas implicadas en la degradación de membranas celulares han sido descritas para otros patógenos necrotrofos de la misma familia como *B. cinerea* (Blanco-Ullate et al., 2014). El gen *Mfccut1* codifica la principal cutinasa de *M. fructicola* y cuenta en su promotor con varios sitios de unión para factores de transcripción que pueden conferir al gen regulación redox (Lee et al., 2010; Wang et al., 2000). Las cepas de *M. fructicola* que sobreexpresan el gen de la cutinasa MfCUT1 causan síntomas más graves (Lee et al. 2010). Por otra parte, hay que remarcar que en estudios previos no se había encontrado actividad cutinasa en *M. fructigena*, estando limitada a *M. fructicola* y *M. laxa* (García-Benitez et al., 2019).

Hasta la fecha, muchos estudios se han centrado en las PGs, considerando estas CWDEs como necesarias para la virulencia de muchos patosistemas (Bravo Ruiz et al., 2016; Vilanova et al., 2018). El gen *pg1* codifica para la principal poligalacturonasa de *Monilinia* spp., cuya regulación hasta ahora se sabía dependiente de pH y la presencia de pectina en el medio (Chou et al., 2015; Rodríguez-Pires et al., 2020a). Sin embargo, el papel fundamental de *MfPG1* en *M. fructicola* que también se había descrito, se ha visto comprometido al comprobar que la virulencia del patógeno disminuye cuando se sobreexpresa (Chou et al., 2015). Por otro lado, se conoce muy poco sobre la regulación de la familia de las celulasas en *Monilinia* spp., no así en *B. cinerea* donde se expresan al menos 15 de estos genes durante el proceso de infección (Blanco-Ullate et al., 2014).

Los genes *pnl1* y *pnl2* de *M. fructicola* 38C muestran mayor grado de fotoinducción en 1% nectarina que durante la infección de fruta. Las PNLs contribuyen a la virulencia en las primeras etapas de la infección en *B. cinerea* (Chilosi & Magro, 1997) y *Alternaria brassicola* (Cho et al., 2015) y también inducen la muerte celular del huésped en las interacciones con *Verticillium dahliae* (Y. Yang et al., 2018) y *Phytophthora capsici* (Fu et al., 2015). Las PNLs actúan preferentemente en pectinas con un mayor grado de esterificación con Ca²⁺ a pH ácido, mientras que la forma de pectato aniónico es el blanco de las pectato liasas (Yadav et al., 2023) donde actúa el factor de transcripción PacC de respuesta al pH que ha sido descrito

como regulador de virulencia en diferentes patógenos de plantas (Roncero et al., 2003; Zhang et al., 2013). *MIPNL2* activa su expresión génica en presencia de pectina (Rodríguez-Pires et al., 2020b) y aumenta de forma significativa su actividad transcripcional como respuesta a irradiación de luz de espectro completo de alta intensidad (Rodríguez-Pires et al., 2021a).

Otro factor de transcripción que juega un papel importante en la regulación de las CAZymes es CRE1, encargado de regular la represión por catabolitos de carbono y cuyo objetivo es evitar la biosíntesis de enzimas para la asimilación de fuentes de carbono alternativas si otras fuentes de carbono más fácilmente metabolizables, como la glucosa o el acetato, están presentes en el medio (Glass et al., 2013). En *Trichoderma spp.* existe una conexión entre esta ruta de señalización y el mecanismo de fotorrecepción a través de la proteína ENV1, homóloga de VVD1, a través de las vías del cAMP y la proteína G heterotrimérica (Schmoll, 2018; Tisch et al., 2011; Tisch & Schmoll, 2010). En el hongo *Neurospora crassa*, organismo modelo en fotobiología, se ha reportado que CRE1 está sujeto a fotoadaptación por parte de VVD1 (Schmoll et al., 2012). El gen *Mfcvvd1* de *M. fructicola* 38C aumenta su actividad transcripcional bajo el tratamiento de luz azul cuando el hongo crece en medio sintético PDB, pero no mientras se lleva a cabo la infección en nectarina. No se ha detectado al homólogo de CRE1 como un gen fotoregulado en ninguna de las especies de *Monilinia*.

El gen *nep2*, codificante para una proteína NEP1-like, responde de manera muy significativa a los estímulos de luz roja y azul durante las primeras horas del proceso de infección de nectarina por parte de *M. fructicola*, y a luz roja en *M. laxa*. En estas dos especies *nep2* se encuentra entre los genes que mayores niveles de fotoinducción muestran. Sin embargo, *M. fructigena* muestra un comportamiento totalmente diferente, aumentando levemente los niveles de actividad transcripcional de *nep1* y *nep2* en condiciones de oscuridad constante. De nuevo encontramos un comportamiento distinto entre las especies de *Monilinia* en cuanto a respuesta a luz se refiere. Las proteínas NEP1-like están descritas como factores de virulencia imprescindibles para el proceso de patogénesis en varias especies de hongos fitopatógenos. *S. sclerotiorum* tiene un gen homólogo, *Scnep2*, cuya delección reduce significativamente la patogenicidad, que puede ser restaurada al complementar el hongo con el alelo silvestre del gen (Yang et al., 2022). Además, se han descrito como factores de virulencia en los hongos *Colletotrichum australisnense* (Liu et al., 2022), *Corynespora cassiicola* (Dal'Sasso et al., 2022), y *Verticillium dahliae* (Santhanam et al., 2013). Sin embargo, su actividad no es

esencial para el proceso de infección por parte de *B. cinerea* (Cuesta Arenas et al., 2010).

Al buscar diferencias en la región promotora de *nep2* que pudieran explicar la disparidad en el comportamiento de este gen frente al estímulo luz en las tres especies de *Monilinia*, se observó que *M. fructicola* 38C y *M. laxa* 8L tienen en el promotor de *nep2* un sitio de unión al complejo *White-Collar* bien conservado, y sin embargo este sitio de unión está ausente en *M. fructigena* Mgena6. Dado que el WCC es el principal factor de transcripción que gobierna la regulación de la luz (Ballario et al., 1996), la falta de dianas de unión del WCC en la secuencia promotora de *nep2* en *M. fructigena* Mgena6 podría explicar por qué no se encontró fotoinducción de *nep2*. Nuestros resultados asocian un aumento de expresión de *nep2* tras un estímulo por luz roja y azul en *M. fructicola* 38C, por luz roja en *M. laxa* 8L, y sin embargo, el WCC cumple con una función de fotorreceptor de luz azul. Esto sugiere la posibilidad de que el WWC regule la actividad transcripcional de *Monilinia* spp. en respuesta a luz de otras longitudes de onda además de la luz azul. Esta hipótesis está respaldada por la bibliografía existente, ya que en *A. nidulans* existe una interacción en el núcleo entre las proteínas LreA y LreB, homólogos de WC-1 y WC-2, FphA, un fitocromo encargado de la detección de luz roja y la proteína velvet VeA. Debido a que la mayoría de FphA se observa en el citoplasma, una pequeña parte debe ser transportada al núcleo para participar en la regulación del complejo fotorreceptor (Corrochano, 2019; Purschwitz et al., 2008, 2009).

Los sitios de unión a WCC también estaban ausentes en las regiones promotoras de *nep1* en las tres especies estudiadas. Las diferencias en los niveles de expresión entre *nep1* y *nep2* también podrían explicarse por la presencia de sitios de regulación PacC en la región promotora de *nep1*. Dado que *nep1* mostró unos niveles de expresión génica muy bajos, mucho menores que *nep2*, y debido al gran número de sitios de unión a PacC en el promotor del gen *nep1* en las tres especies, nuestra hipótesis es que *nep1* se expresa más tarde en el proceso de infección, cuando el proceso de secreción de ácido glucónico por *Monilinia* ha acidificado los tejidos del hospedador, desactivando la función represora de PacC a pH alcalino (De Cal et al., 2013). También es posible que exista otro regulador positivo que aumente la actividad de *nep1* a pH ácido mientras PacC la mantiene reprimida en pH neutro o alcalino. En *B. cinerea* existe una relación entre la familia de genes reguladores *velvet*, involucrados con el proceso de fotorrecepción, y la regulación génica de las CAZymes y el proceso de acidificación de los tejidos del huésped

durante la infección. Varias cepas mutantes en los genes *BcVel1* y *BcLae1*, homólogos de la familia *velvet* de *Monilinia* spp., mostraron niveles de producción de ácido cítrico y OA reducidos, perdiendo la habilidad de colonizar el tejido del huésped. Además, mostraron unos niveles de actividad transcripcional de multitud de genes codificantes de CAZymes muy reducidos en comparación a las cepas silvestres (Müller et al., 2018; Schumacher et al., 2015). Del mismo modo, una cepa mutante en el gen *Bcphy3* mostró significativamente menor patogenicidad en diferentes tejidos vegetales (Hu et al., 2014).

Se ha demostrado, por primera vez, que la luz puede regular el comportamiento tanto de CAZymes como de NLPs para ayudar, especialmente, a la actividad patógena de *M. fructicola* y *M. laxa*, acelerando la ruptura de la pared celular y de la membrana celular respectivamente, por lo que podría existir un modo de acción sinérgico de CAZymes y NLPs en la actividad patogénica de *Monilinia* spp. Este aumento en la actividad transcripcional de los factores de virulencia se aprecia especialmente en aquellas muestras que presentan un periodo de latencia reducido, causado por la influencia de las luces roja y azul, principalmente en *M. fructicola*, pero también en *M. laxa* 8L. Por el contrario, la expresión de CAZy y NLPs se mantuvo a bajos niveles en *M. fructigena* Mgena6, y aumentó lentamente con el tiempo en la oscuridad. Esto revela un comportamiento completamente diferente entre las tres especies de *Monilinia* causantes de la podredumbre parda, sugiriendo que, aunque todas las *Monilinia* spp. portan un conjunto similar de CWDEs y fotorreceptores, existen diferencias en la regulación de sus niveles de expresión causadas por la luz, teniendo un impacto en el desarrollo de la podredumbre parda. Ya se había establecido un nexo de unión entre los fotorreceptores y la capacidad para causar enfermedad por parte de otros hongos y bacterias patógenas (Idnurm & Heitman, 2005; Ruiz-Roldán et al., 2008; Swartz et al., 2007). Sin embargo, solo se habían descrito un conjunto de fotorreceptores muy conservado con otros hongos sensibles a la luz para *M. laxa*, sugiriendo para ellos funciones en el desarrollo y la dispersión de este patógeno (Rodríguez-Pires et al., 2021b). Se identificaron posibles fotorreceptores en *M. laxa* para la luz azul (“*White Collar*” y criptocromos), verde (opsinas), roja (fitocromos) y para las proteínas velvet, familia reguladora relacionada con la fotorrespuesta (Rodríguez-Pires et al., 2021b). Análisis transcripcionales de estos genes se realizaron bajo luz diurna o luz de color específico, y tanto en tiempo de luz diurna o luz de color específica, y ambos con iluminación temporal, encontrándose expresión génica desencadenada dependiente de la luz de *Mlvel2*, *Mlphy2*, *Mlops2* y *Mlcry2*, y la luz

de color como inductor positivo de la expresión de *Mlvel3*, *Mlvel4*, *Mlphy1* y *Mlcry1* (Rodríguez-Pires et al., 2021b).

M. fructigena Mgena6 cuenta con una estrategia de infección-colonización de las nectarinas diferente a las otras dos especies y también es distinta su fotorrecepción, respuesta y regulación frente a luz, mostrándose parcialmente ciega frente a ella. Hemos usamos técnicas de secuenciación masiva RNAseq para analizar la respuesta transcripcional de *M. fructigena* Mgena6 al estímulo luz blanca durante los primeros momentos del desarrollo de podredumbre parda sobre nectarina. Nuestros resultados indican que, a pesar de que en ese estrecho margen de tiempo el hongo no haya tenido ocasión causar síntomas visibles, la luz afecta de forma negativa a la expresión génica de ciertas enzimas potencialmente relacionadas con el desarrollo de la podredumbre parda como PNL2 y CUT1. *M. fructigena* se sitúa en una posición desfavorable frente a las otras dos especies de *Monilinia*, que no muestran una reducción de la actividad CAZyme tras la irradiación de luz de 14 h, duración de un día de Julio en plena campaña de cosecha. Esto podría ayudar a explicar las diferencias de virulencia entre las especies de *Monilinia* y proporcionar una razón para el desplazamiento actual de *M. fructigena* de los huertos de fruta de hueso a los de fruta de pepita (Abate et al., 2018; Villarino et al., 2013), huertos estos últimos en zonas más frescas y con fechas de cosechas más tardías y menos luminosas.

Los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta tesis demuestran que la luz juega un papel regulatorio en el desarrollo de la podredumbre parda, y que las distintas especies de *Monilinia* responden al estímulo luz, a su longitud de onda y al fotoperiodo de forma diferente, a pesar de que todas cuentan con la misma batería de fotorreceptores. La luz de distintas longitudes de onda influye en la tasa de crecimiento diario de las tres especies estudiadas de forma diferente. Sólo en *M. fructicola* se acelera la aparición de síntomas de enfermedad bajo la influencia de luz roja o azul, lo que le añade una franja de tiempo óptimo extra, durante el día, para la infección-colonización del fruto de esta especie respecto a las otras dos. Las tres especies tienen a su disposición un número muy similar de genes codificantes de CAZymes, además de dos NLPs. Esta batería de CWDEs está muy conservada entre especies y, sin embargo, observamos diferencias a nivel regulatorio ocasionadas por la luz, que podrían explicar el diferente nivel de virulencia entre especies. *M. fructicola* y *M. laxa* mostraron una fotoinducción de un grupo selecto de genes codificantes de CWDEs similar frente a la luz roja, mientras que *M.*

fructigena siguió un patrón transcripcional totalmente opuesto. Este grupo incluye CAZymes bien estudiadas como *pg1* y *pme3*, además de los genes *nep1* y *nep2*.

Sin embargo, y a pesar de las contribuciones de esta tesis al conocimiento sobre *Monilinia* spp., estos estudios no están carentes de limitaciones, como la ausencia de estudios funcionales de genes o proteínas, motivada por la imposibilidad de producir de forma fiable cepas transformantes de *Monilinia* spp. Hasta donde sabemos, a fecha de la escritura de esta tesis no existe un protocolo fiable para la mutagénesis dirigida en *M. laxa* y *M. fructigena*, y mientras que en *M. fructicola* sí hay pruebas de transformaciones exitosas usando técnicas basadas en la integración y sustitución génica mediada por ADN-T de *Agrobacterium tumefaciens* (Rodríguez-Pires et al., 2019), los resultados son normalmente impredecibles, y *M. fructicola* tiene la tendencia a perder el ADN integrado y regresar a su estado salvaje debido a su naturaleza heterocarionte y la gran variabilidad de núcleos en conidias, hifas y protoplastos. En esta tesis se ha intentado solventar dicha limitación usando aislados con distintas características de virulencia y comparando su respuesta frente al mismo estímulo, pero la transformación genética sigue siendo la herramienta predilecta para determinar la función de un gen. Recientemente se ha descrito un método que permite la expresión de factores de virulencia o efectores de *Monilinia* spp., en plantas de forma transitoria, por agroinfiltración mediante un sistema de expresión modificado basado en *Tobacco Rattle Virus* (TRV) (López et al., 2024). En el futuro se espera contar con técnicas que permitan la transformación de *Monilinia* spp. de manera fiable y consistente, para poder llevar a cabo experimentos con mutantes *knockout* o que sobre expresen genes de interés, que permitirían avanzar en el conocimiento sobre la función de multitud de genes en el desarrollo de la podredumbre parda.

Los resultados presentados sirven para completar los cuatro objetivos con los que se plantea la presente tesis, además de establecer un marco teórico adecuado para futuras investigaciones que ahonden en los mecanismos regulatorios que gobiernan el desarrollo de la podredumbre parda. Determinar el papel que cumplen las proteínas NEP1-like como NEP2 en el desarrollo de la enfermedad, caracterizar la posible función y papel del gen *far1* en el proceso de fotorrecepción de *Monilinia* spp., esclarecer la función de *vvd1* en el proceso de fotoadaptación y su relación con el WCC, determinar cuál es el papel de la familia de proteínas *velvet* en la patogénesis de *Monilinia* spp. y su posible relación con el complejo fotorreceptor, o comprender mejor el sistema de regulación de las CAZymes y su

posible implicación en las diferentes preferencias de huésped que existen entre *M. fructicola*, *M. laxa* y *M. fructigena* son algunas de las futuras líneas de investigación que los resultados de esta tesis hacen posible.

6. Conclusiones

1. Las luces de distinta longitud de onda afectan al crecimiento y esporulación de *Monilinia* spp. de forma dependiente de la especie
 - a. La luz roja produce un aumento en la tasa de crecimiento diario en *M. fructicola* 38C bajo fotoperiodos de 8 y 12 horas, mientras que el resto de las longitudes de onda ralentiza su crecimiento.
 - b. La luz blanca inhibe la producción de conidias en *M. fructicola* 38C, pero no en *M. fructicola* 1C
 - c. Todas las luces producen una reducción en la tasa de crecimiento de *M. fructigena* Mgena6 en el fotoperiodo de 8 h, pero sólo las luces blanca, verde y ultravioleta cercano hacen lo mismo en el fotoperiodo de 12 h.
 - d. No se han encontrado condiciones de iluminación que induzcan la producción de conidias en *M. fructigena* Mgena6
2. Las tres especies de *Monilinia* causantes de podredumbre parda en huertos españoles cuentan con un set de fotorreceptores idénticos
 - a. Dicho set está compuesto por tres fitocromos (*phy1*, *phy2* y *phy3*), dos criptocromos (*cry1* y *cry2*), tres proteínas pertenecientes a dos categorías distintas de Light, Voltage, Oxygen (LOVs, *wcl1*, *wcl2* y *vvd1*), y dos rodopsinas (*op1* y *op2*).
3. La maquinaria fotorreceptora modifica su actividad transcripcional en respuesta a luz en casos concretos
 - a. La luz blanca causa fotoinducción de los genes *Mfcvvd1*, *Mfcfar1*, *Mfccry1*, *Mfccry2*, *Mfcphy2* y *Mfcop2* cuando *M. fructicola* 38C crece en medio sintético PDB, y sólo de *Mfcvvd1* y *Mfcfar1* cuando lo hace sobre nectarina.
 - b. Hemos podido describir el gen *Mfcfar1*, ampliamente distribuido en hongos ascomicetos y sin función descrita, pero fuertemente fotoinducido tanto en medio sintético como en fruta
 - c. *M. fructigena* Mgena6 experimenta fotoinducción por luz blanca de los genes *Mfgcry1*, *Mfgvvd1*, *Mfglov3*, *Mfglov4* y *Mfgfrq1*
4. Las tres especies de *Monilinia* codifican en su genoma para un conjunto de factores de virulencia muy similar

- a. Se identificaron un total de 414, 398 y 383 CAZymes en los genomas de *M. fructicola* 38C, *M. laxa* 8L y *M. fructigena* Mgena6, respectivamente.
 - b. En el genoma de las tres especies de *Monilinia* se localizan dos genes codificantes para proteínas NEP1-like, *nep1* y *nep2*.
 - c. La secuencia aminoacídica de las NLPs está muy conservada en *Monilinia* spp. Y los modelos predicen estructuras similares a las conocidas y similitud en su modo de acción.
 - d. *M. fructicola* 38C y *M. laxa* 8L cuentan con sitios de unión para el WCC en el promotor de *nep2*, pero no *M. fructigena* Mgena6.
5. La aparición de síntomas de enfermedad en *M. fructicola* 38C viene acompañada por un aumento de la actividad transcripcional en un grupo genes que codifican para factores de virulencia
- a. Los genes *Mfcpme3*, *Mfcpme2*, *Mfcpg1*, *Mfccell1*, *Mfcpnl1*, *Mfcpnl2* y *Mfcnep2* experimentan fotoinducción en *M. fructicola* 38C durante las primeras horas del proceso de infección sobre nectarina.
 - b. *M. laxa* experimenta una menor fotoinducción en los mismos genes, mientras que *M. fructigena* sólo experimenta fotoinducción en *Mfgpnl2* y los genes *Mfgpme3*, *Mfgpme2*, *Mfgcut1*, *Mfgcell1*, *Mfgpnl1* y *Mfgnep2* vieron sus niveles de expresión génica aumentados en condiciones de oscuridad.
6. *M. fructicola* 38C muestra diferencias, propiciadas por luz roja y azul, en los niveles de expresión génica de CAZymes y *Mfcnep2* al crecer sobre distintos medios de cultivo sintético y sobre fruta.
- a. Solamente las luces roja y azul reducen el periodo de latencia en *M. fructicola* 38C, acelerando la aparición de síntomas de enfermedad tras 14 h de exposición a estas longitudes de onda.

7. Referencias

- Abate, D., De Miccolis Angelini, R. M., Rotolo, C., Pollastro, S., & Faretra, F. (2018). Mating system in the brown rot pathogens *Monilinia fructicola*, *M. laxa*, and *M. fructigena*. *Phytopathology*, *108*(11), 1315–1325. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-03-18-0074-R>
- Abate, D., Pastore, C., Gerin, D., De Miccolis Angelini, R. M., Rotolo, C., Pollastro, S., & Faretra, F. (2018). Characterization of *Monilinia* spp. Populations on stone fruit in south italy. *Plant Disease*, *102*(9), 1708–1717. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-17-1314-RE>
- Amselem, J., Cuomo, C. A., van Kan, J. A. L., Viaud, M., Benito, E. P., Couloux, A., Coutinho, P. M., de Vries, R. P., Dyer, P. S., Fillinger, S., Fournier, E., Gout, L., Hahn, M., Kohn, L., Lapalu, N., Plummer, K. M., Pradier, J. M., Quévillon, E., Sharon, A., ... Dickman, M. (2011). Genomic analysis of the necrotrophic fungal pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. *PLoS Genetics*, *7*(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002230>
- Bae, H., Bowers, J. H., Tooley, P. W., & Bailey, B. A. (2005). NEP1 orthologs encoding necrosis and ethylene inducing proteins exist as a multigene family in *Phytophthora megakarya*, causal agent of black pod disease on cacao. *Mycological Research*, *109*(12), 1373–1385. <https://doi.org/10.1017/S0953756205003941>
- Bailey A. Bryan. (1995). Purification of a Protein From Culture Filtrates of *Fusarium oxysporum* that Induces Ethylene and Necrosis in Leaves of *Erythroxylum coca*. *Phytopathology*, *85*, 1250–1255.
- Ballario, P., Vittorioso, P., Magrelli, A., Talora, C., Cabibbo, A., Macino, G., Sapienza, L., di Biopatologia Umana, D., Umberto, P. I., & Regina Margherita, V. (1996). White collar-1, a central regulator of blue light responses in *Neurospora*, is a zinc finger protein. In *The EMBO Journal* (Vol. 15, Issue 7).
- Balsells-Llauradó, M., Torres, R., Vall-llaura, N., Casals, C., Teixidó, N., & Usall, J. (2021). Light Intensity Alters the Behavior of *Monilinia* spp. in vitro and the Disease Development on Stone Fruit-Pathogen Interaction. *Frontiers in Plant Science*, *12*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.666985>

- Bannon, F., Gort, G., van Leeuwen, G., Holb, I., & Jeger, M. (2009). Diurnal patterns in dispersal of *Monilinia fructigena* conidia in an apple orchard in relation to weather factors. *Agricultural and Forest Meteorology*, *149*(3–4), 518–525. <https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2008.10.001>
- Baró-Montel, N., Vall-llaura, N., Usall, J., Teixidó, N., Naranjo-Ortíz, M. A., Gabaldón, T., & Torres, R. (2019). Pectin methyl esterases and rhamnogalacturonan hydrolases: weapons for successful *Monilinia laxa* infection in stone fruit? *Plant Pathology*, *68*(7), 1381–1393. <https://doi.org/10.1111/ppa.13039>
- Bateman, A., Martin, M. J., Orchard, S., Magrane, M., Ahmad, S., Alpi, E., Bowler-Barnett, E. H., Britto, R., Bye-A-Jee, H., Cukura, A., Denny, P., Dogan, T., Ebenezer, T. G., Fan, J., Garmiri, P., da Costa Gonzales, L. J., Hatton-Ellis, E., Hussein, A., Ignatchenko, A., ... Zhang, J. (2023). UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2023. *Nucleic Acids Research*, *51*(D1), D523–D531. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1052>
- Bayram, Ö., & Braus, G. H. (2012). Coordination of secondary metabolism and development in fungi: The velvet family of regulatory proteins. In *FEMS Microbiology Reviews* (Vol. 36, Issue 1, pp. 1–24). <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00285.x>
- Bayram, Ö., Braus, G. H., Fischer, R., & Rodriguez-Romero, J. (2010). Spotlight on *Aspergillus nidulans* photosensory systems. In *Fungal Genetics and Biology* (Vol. 47, Issue 11, pp. 900–908). <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2010.05.008>
- Bernat, M., Segarra, J., Xu, X. M., Casals, C., & Usall, J. (2017). Influence of temperature on decay, mycelium development and sporodochia production caused by *Monilinia fructicola* and *M. laxa* on stone fruits. *Food Microbiology*, *64*, 112–118. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.12.016>
- Bevacqua, D., Vanalli, C., Casagrandi, R., & Gatto, M. (2023). A climate-driven compartmental model for fungal diseases in fruit orchards: The impacts of climate change on a brown rot-peach system. *Agricultural and Forest Meteorology*, *332*. <https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2022.109293>
- Biggs, A. R., & Northover, J. (1988). Early and Late-Season Susceptibility of Peach Fruits to *Monilinia fructicola*. *Plant Disease*, *72*, 1070–1074.

- Blanco-Ulate, B., Morales-Cruz, A., Amrine, K. C. H., Labavitch, J. M., Powell, A. L. T., & Cantu, D. (2014). Genome-wide transcriptional profiling of *Botrytis cinerea* genes targeting plant cell walls during infections of different hosts. *Frontiers in Plant Science*, *5*(SEP). <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00435>
- Bobev, S. G., Angelov, L. T., Van Poucke, K., & Maes, M. (2020). First Report of Brown Rot on Peach, Nectarine, Cherry, and Plum Fruits Caused by *Monilinia fructicola* in Bulgaria. *Plant Disease*, *104*(5), 1561. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-19-2094-PDN>
- Bosshard, E., Hilber-Bodmer, M., Schärer, H.-J., Bünter, M., & Duffy, B. (2006). First Report of the Quarantine Brown Rot Pathogen *Monilinia fructicola* on Imported Stone Fruits in Switzerland. *Plant Disease*, *90*(12), 1554. <https://doi.org/10.1094/PD-90-1554C>
- Bostock, R. M., Wilcox, S. M., Wang, G., & Adaskaveg, J. E. (1999). Suppression of *Monilinia fructicola* cutinase production by peach fruit surface phenolic acids. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, *54*, 37–50.
- Brandhoff, B., Simon, A., Dornieden, A., & Schumacher, J. (2017). Regulation of conidiation in *Botrytis cinerea* involves the light-responsive transcriptional regulators BcLTF3 and BcREG1. *Current Genetics*, *63*(5), 931–949. <https://doi.org/10.1007/s00294-017-0692-9>
- Bravo Ruiz, G., Di Pietro, A., & Roncero, M. I. G. (2016). Combined action of the major secreted exo- and endopolygalacturonases is required for full virulence of *Fusarium oxysporum*. *Molecular Plant Pathology*, *17*(3), 339–353. <https://doi.org/10.1111/mpp.12283>
- Byrde, R. J. W., & Willetts, H. J. (1977). TAXONOMY AND NOMENCLATURE. In *The Brown Rot Fungi of Fruit* (pp. 15–31). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-019740-1.50009-5>
- Canessa, P., Schumacher, J., Hevia, M. A., Tudzynski, P., & Larrondo, L. F. (2013). Assessing the effects of light on differentiation and virulence of the plant pathogen *Botrytis cinerea*: Characterization of the white collar complex. *PLoS ONE*, *8*(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084223>
- Cantu, D., Vicente, A. R., Labavitch, J. M., Bennett, A. B., & Powell, A. L. T. (2008). Strangers in the matrix: plant cell walls and pathogen

- susceptibility. *Trends in Plant Science*, *13*(11), 610–617. <https://doi.org/10.1016/J.TPLANTS.2008.09.002>
- Carvalho, S. D., & Castillo, J. A. (2018). Influence of Light on Plant–Phyllosphere Interaction. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 9). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01482>
- Casadevall, A., & Pirofski, L. A. (2009). Virulence factors and their mechanisms of action: The view from a damage-response framework. In *Journal of Water and Health* (Vol. 7, Issue SUPPL. 1). <https://doi.org/10.2166/wh.2009.036>
- Casals, C., Segarra, J., Torres, R., Teixidó, N., De Cal, A., & Usall, J. (2023). Validation of a Warning System to Control Brown Rot in Peach and Nectarine. *Agronomy*, *13*(1). <https://doi.org/10.3390/agronomy13010254>
- Casals, C., Viñas, I., Torres, R., Griera, C., & Usall, J. (2010). Effect of temperature and water activity on in vitro germination of *Monilinia* spp. *Journal of Applied Microbiology*, *108*(1), 47–54. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04402.x>
- Cerón-Bustamante, M., Tini, F., Beccari, G., Benincasa, P., & Covarelli, L. (2023). Effect of Different Light Wavelengths on *Zymoseptoria tritici* Development and Leaf Colonization in Bread Wheat. *Journal of Fungi*, *9*(6), 670. <https://doi.org/10.3390/jof9060670>
- Cerri, M., & Reale, L. (2020). Anatomical traits of the principal fruits: An overview. In *Scientia Horticulturae* (Vol. 270). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109390>
- Chen, C. H., DeMay, B. S., Gladfelter, A. S., Dunlap, J. C., & Loros, J. J. (2010). Physical interaction between vivid and white collar complex regulates photoadaptation in *Neurospora*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(38), 16715–16720. <https://doi.org/10.1073/pnas.1011190107>
- Chilosi, G., & Magro, P. (1997). Pectin Lyase and Polygalacturonase Isoenzyme Production by *Botrytis Cinerea* During the Early Stages of Infection on Different Host Plants. *Journal of Plant Pathology*, *79*(1), 61–69. <http://www.jstor.org/stable/41997868>
- Cho, Y., Jang, M., Srivastava, A., Jang, J. H., Soung, N. K., Ko, S. K., Kang, D. O., Ahn, J. S., & Kim, B. Y. (2015). A pectate lyase-coding gene

- abundantly expressed during early stages of infection is required for full virulence in *Alternaria brassicicola*. *PLoS ONE*, 10(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127140>
- Chou, C. M., Yu, F. Y., Yu, P. L., Ho, J. F., Bostock, R. M., Chung, K. R., Huang, J. W., & Lee, M. H. (2015). Expression of five endopolygalacturonase genes and demonstration that MfPG1 overexpression diminishes virulence in the brown rot pathogen *Monilinia fructicola*. *PLoS ONE*, 10(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132012>
- Cohrs, K. C., & Schumacher, J. (2017). The Two Cryptochrome/Photolyase Family Proteins Fulfill Distinct Roles in DNA Photorepair and Regulation of Conidiation in the Gray Mold Fungus *Botrytis cinerea*. <https://doi.org/10.1128/AEM>
- Corrochano, L. M. (2019). Annual Review of Genetics Light in the Fungal World: From Photoreception to Gene Transcription and Beyond. *Annu. Rev. Genet*, 53, 149–170. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120417>
- Cuesta Arenas, Y., Kalkman, E. R. I. C., Schouten, A., Dieho, M., Vredenburg, P., Uwumukiza, B., Osés Ruiz, M., & van Kan, J. A. L. (2010). Functional analysis and mode of action of phytotoxic Nep1-like proteins of *Botrytis cinerea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 74(5–6), 376–386. <https://doi.org/10.1016/j.pmp.2010.06.003>
- Dal’Sasso, T. C. da S., Rocha, V. D. da, Rody, H. V. S., Costa, M. D. B. L., & Oliveira, L. O. de. (2022). The necrosis- and ethylene-inducing peptide 1-like protein (NLP) gene family of the plant pathogen *Corynespora cassiicola*. *Current Genetics*, 68(5–6), 645–659. <https://doi.org/10.1007/s00294-022-01252-0>
- Dal’Sasso, T. C. S., Rody, H. V. S., & Oliveira, L. O. (2023). Genome-Wide Analysis and Evolutionary History of the Necrosis- and Ethylene-Inducing Peptide 1-Like Protein (NLP) Superfamily Across the *Dothideomycetes* Class of Fungi. *CURRENT MICROBIOLOGY*, 80(1). <https://doi.org/10.1007/s00284-022-03125-8>
- De Cal, A., Egüen, B., & Melgarejo, P. (2014). Vegetative compatibility groups and sexual reproduction among Spanish *Monilinia fructicola* isolates obtained from peach and nectarine orchards, but not *Monilinia laxa*.

- Fungal Biology*, *118*(5–6), 484–494.
<https://doi.org/10.1016/j.funbio.2014.03.007>
- De Cal, A., Gell, I., Usall, J., Viñas, I., & Melgarejo, P. (2009). First report of brown rot caused by *Monilinia fructicola* in peach orchards in Ebro Valley, Spain. *Plant Disease*, *93*(7), 763. <https://doi.org/10.1094/PDIS-93-7-0763A>
- De Cal, A., & Melgarejo, P. (1994). Effects Of *Penicilium Frequentans* And Its Antibiotics On Unmelanized Hyphae Of *Monilinia Laxa*. *PHYTOPATHOLOGY*, *84*(10), 1010–1014.
- De Cal, A., & Melgarejo, P. (1999). Effects of Long-Wave UV Light on *Monilinia* Growth and Identification of Species.
- De Cal, A., & Melgarejo, P. (2000). Momificado de los frutales de hueso. In Mundi-Prensa (Ed.), *Enfermedades de los frutales de Pepita y de Hueso* (pp. 66–67).
- De Cal, A., Sandín-España, P., Martínez, F., Egüen, B., Chien-Ming, C., Lee, M. H., Melgarejo, P., & Prusky, D. (2013). Role of gluconic acid and pH modulation in virulence of *Monilinia fructicola* on peach fruit. *Postharvest Biology and Technology*, *86*, 418–423.
<https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2013.07.012>
- De Lucca, A. J., Carter-Wientjes, C., Williams, K. A., & Bhatnagar, D. (2012). Blue light (470 nm) effectively inhibits bacterial and fungal growth. *Letters in Applied Microbiology*, *55*(6), 460–466.
<https://doi.org/10.1111/lam.12002>
- De Miccolis Angelini, R. M., Abate, D., Rotolo, C., Gerin, D., Pollastro, S., & Faretra, F. (2018). De novo assembly and comparative transcriptome analysis of *Monilinia fructicola*, *Monilinia laxa* and *Monilinia fructigena*, the causal agents of brown rot on stone fruits. *BMC Genomics*, *19*(1).
<https://doi.org/10.1186/s12864-018-4817-4>
- De Miccolis Angelini, R. M., Landi, L., Raguseo, C., Pollastro, S., Faretra, F., & Romanazzi, G. (2022). Tracking of Diversity and Evolution in the Brown Rot Fungi *Monilinia fructicola*, *Monilinia fructigena*, and *Monilinia laxa*. *Frontiers in Microbiology*, *13*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.854852>
- de Oliveira, G. A. P., Pereira, E. G., Dias, C. V., Souza, T. L. F., Ferretti, G. D. S., Cordeiro, Y., Camillo, L. R., Cascardo, J., Almeida, F. C., Valente, A. P., & Silva, J. L. (2012). *Moniliophthora perniciosa* Necrosis- and

- Ethylene-Inducing Protein 2 (MpNep2) as a Metastable Dimer in Solution: Structural and Functional Implications. *PLoS ONE*, 7(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045620>
- Dowling, M., Ritchie, D. F., & Schnabel, G. (2019). Brown rot of stone fruits. *The Plant Health Instructor*, 19. <https://doi.org/10.1094/PHI-I-2000-1025-01>
- Drula, E., Garron, M. L., Dogan, S., Lombard, V., Henrissat, B., & Terrapon, N. (2022). The carbohydrate-active enzyme database: Functions and literature. *Nucleic Acids Research*, 50(D1), D571–D577. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1045>
- Duchoslavová, J., Širučková, I., Zapletalová, E., Navrátil, M., & Šafářová, D. (2007). First Report of Brown Rot Caused by *Monilinia fructicola* on Various Stone and Pome Fruits in the Czech Republic. *Plant Disease*, 91(7), 907. <https://doi.org/10.1094/PDIS-91-7-0907B>
- EPPO, & CABI. (1997). *Monilinia fructicola*. In: Quarantine Pests for Europe (I. Smith, D. McNamara, P. Scott, & M. Holderness, Eds.; 2nd ed.). CAB International.
- Espeso, E. A., Villarino, M., Carreras, M., Alonso-Guirado, L., Alonso, J. M., Melgarejo, P., & Larena, I. (2019). Altered nitrogen metabolism in biocontrol strains of *Penicillium rubens*. *Fungal Genetics and Biology*, 132. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2019.103263>
- Fernández, V., Khayet, M., Montero-Prado, P., Heredia-Guerrero, J., Liakopoulos, G., Karabourniotis, G., del Río, V., Domínguez, E., Tacchini, I., Nerín, C., Val, J., & Heredia, A. (2011). New insights into the properties of pubescent surfaces: Peach fruit as a model. *Plant Physiology*, 156(4), 2098–2108. <https://doi.org/10.1104/pp.111.176305>
- Fu, L., Zhu, C., Ding, X., Yang, X., Morris, P. F., Tyler, B. M., & Zhang, X. (2015). Characterization of cell-death-inducing members of the pectate lyase gene family in *Phytophthora capsici* and their contributions to infection of pepper. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 28(7), 766–775. <https://doi.org/10.1094/MPMI-11-14-0352-R>
- G. C. Wade, & R. H. Cruickshank. (1992). Rapid Development of Resistance of Wounds on Immature Apricot Fruit to Infection with *Monilinia fructicola*. *Journal of Phytopathology*, 136(2), 89–94.

- Gambino, G., Perrone, I., & Gribaudo, I. (2008). A rapid and effective method for RNA extraction from different tissues of grapevine and other woody plants. *Phytochemical Analysis*, *19*(6), 520–525. <https://doi.org/10.1002/pca.1078>
- Garcia-Benitez, C., Melgarejo, P., & De Cal, A. (2017a). Detection of Latent *Monilinia* infections in nectarine flowers and fruit by qPCR. *Plant Disease*, *101*(6), 1002–1008. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-16-1682-RE>
- Garcia-Benitez, C., Melgarejo, P., & De Cal, A. (2017b). Fruit maturity and post-harvest environmental conditions influence the pre-penetration stages of *Monilinia* infections in peaches. *International Journal of Food Microbiology*, *241*, 117–122. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.09.010>
- Garcia-Benitez, C., Melgarejo, P., De Cal, A., & Fontaniella, B. (2016). Microscopic analyses of latent and visible *Monilinia fructicola* infections in nectarines. *PLoS ONE*, *11*(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160675>
- Garcia-Benitez, C., Melgarejo, P., Sandin-España, P., Sevilla-Morán, B., & De Cal, A. (2019). Degrading enzymes and phytotoxins in *Monilinia* spp. *European Journal of Plant Pathology*, *154*(2), 305–318. <https://doi.org/10.1007/s10658-018-01657-z>
- Gell, I., Cubero, J., & Melgarejo, P. (2007). Two different PCR approaches for universal diagnosis of brown rot and identification of *Monilinia* spp. in stone fruit trees. *Journal of Applied Microbiology*, *103*(6), 2629–2637. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03495.x>
- Gell, I., De Cal, A., Torres, R., Usall, J., & Melgarejo, P. (2008). Relationship between the incidence of latent infections caused by *Monilinia* spp. and the incidence of brown rot of peach fruit: Factors affecting latent infection. *European Journal of Plant Pathology*, *121*(4), 487–498. <https://doi.org/10.1007/s10658-008-9268-3>
- Gell, I., De Cal, A., Torres, R., Usall, J., & Melgarejo, P. (2009). Conidial density of *Monilinia* spp. on peach fruit surfaces in relation to the incidences of latent infections and brown rot. *European Journal of Plant Pathology*, *123*(4), 415–424. <https://doi.org/10.1007/s10658-008-9378-y>

- Götz, S., García-Gómez, J. M., Terol, J., Williams, T. D., Nagaraj, S. H., Nueda, M. J., Robles, M., Talón, M., Dopazo, J., & Conesa, A. (2008). High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. *Nucleic Acids Research*, *36*(10), 3420–3435. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn176>
- Grabke, A., Hu, M. J., Luo, C. X., Bryson, P. K., & Schnabel, G. (2011). First Report of Brown Rot of Apple Caused by *Monilinia fructicola* in Germany. *Plant Disease*, *95*(6), 772. <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-11-0113>
- Heintzen, C. (2012). Plant and fungal photopigments. In *Wiley Interdisciplinary Reviews: Membrane Transport and Signaling* (Vol. 1, Issue 4, pp. 411–432). <https://doi.org/10.1002/wmts.36>
- Hevia, M. A., Canessa, P., & Larrondo, L. F. (2016). Circadian clocks and the regulation of virulence in fungi: Getting up to speed. In *Seminars in Cell and Developmental Biology* (Vol. 57, pp. 147–155). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.03.021>
- Hevia, M. A., Canessa, P., Müller-Esparza, H., & Larrondo, L. F. (2015). A circadian oscillator in the fungus *Botrytis cinerea* regulates virulence when infecting *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(28), 8744–8749. <https://doi.org/10.1073/pnas.1508432112>
- Hoff, K. J., & Stanke, M. (2013). WebAUGUSTUS--a web service for training AUGUSTUS and predicting genes in eukaryotes. *Nucleic Acids Research*, *41*(Web Server issue). <https://doi.org/10.1093/nar/gkt418>
- Horbach, R., Navarro-Quesada, A. R., Knogge, W., & Deising, H. B. (2011). When and how to kill a plant cell: Infection strategies of plant pathogenic fungi. In *Journal of Plant Physiology* (Vol. 168, Issue 1, pp. 51–62). <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2010.06.014>
- Hrustić, J., Mihajlović, M., Tanović, B., Delibašić, G., Stanković, I., Krstić, B., & Bulajić, A. (2013). First Report of Brown Rot Caused by *Monilinia fructicola* on Nectarine in Serbia. *Plant Disease*, *97*(1), 147. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-12-0718-PDN>
- Hu, Y., He, J., Wang, Y., Zhu, P., Zhang, C., Lu, R., & Xu, L. (2014). Disruption of a phytochrome-like histidine kinase gene by homologous recombination leads to a significant reduction in vegetative growth, sclerotia production,

- and the pathogenicity of *Botrytis cinerea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, *85*, 25–33. <https://doi.org/10.1016/j.pmp.2013.12.002>
- Idnurm, A., & Crosson, S. (2009). The photobiology of microbial pathogenesis. In *PLoS Pathogens* (Vol. 5, Issue 11). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000470>
- Idnurm, A., & Heitman, J. (2005). Light controls growth and development via a conserved pathway in the fungal kingdom. *PLoS Biology*, *3*(4), 0615–0626. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030095>
- Igbalajobi, O., Yu, Z., & Fischer, R. (2019). Red-and Blue-Light Sensing in the Plant Pathogen *Alternaria alternata* Depends on Phytochrome and the White-Collar Protein LreA. <https://doi.org/10>
- Islam, S. Z., & Honda, Y. (1998). Phototropism of Conidial Germ Tubes of *Botrytis cinerea* and Its Implication in Plant Infection Processes. In *Plant Disease* (Vol. 82, Issue 8).
- Janitor A. (1970). Influence of artificial radiation on the vegetative growth and the formation of the fruiting organs in *Monilia fructigena* (Pers. ex Pers.) Steud. *Ěeská Mykologie*, *24*(4), 198–206.
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Žídek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S. A. A., Ballard, A. J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., ... Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, *596*(7873), 583–589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>
- Kahramanoğlu, I., Nisar, M. F., Chen, C., Usanmaz, S., Chen, J., & Wan, C. (2020). Light: An Alternative Method for Physical Control of Postharvest Rotting Caused by Fungi of Citrus Fruit. In *Journal of Food Quality* (Vol. 2020). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2020/8821346>
- Karakkat, B. B., Gold, S. E., & Covert, S. F. (2013). Two members of the *Ustilago maydis* velvet family influence teliospore development and virulence on maize seedlings. *Fungal Genetics and Biology*, *61*, 111–119. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2013.09.002>
- Kars, I., McCalman, M., Wagemakers, L., & Van Kan, J. A. L. (2005). Functional analysis of *Botrytis cinerea* pectin methylesterase genes by PCR-based targeted mutagenesis: *Bcpme1* and *Bcpme2* are dispensable

- for virulence of strain B05.10. *Molecular Plant Pathology*, *6*(6), 641–652. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2005.00312.x>
- Kim, H. J., Han, J. H., Kim, K. S., & Lee, Y. H. (2014). Comparative functional analysis of the velvet gene family reveals unique roles in fungal development and pathogenicity in *Magnaporthe oryzae*. *Fungal Genetics and Biology*, *66*, 33–43. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2014.02.011>
- Kotilainen, T., Aphalo, P. J., Brelsford, C. C., Böök, H., Devraj, S., Heikkilä, A., Hernández, R., Kylling, A., Lindfors, A. V., & Robson, T. M. (2020). Patterns in the spectral composition of sunlight and biologically meaningful spectral photon ratios as affected by atmospheric factors. *Agricultural and Forest Meteorology*, *291*. <https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2020.108041>
- Kreidl, S., Edwards, J., & Villalta, O. N. (2015). Assessment of pathogenicity and infection requirements of *Monilinia* species causing brown rot of stone fruit in Australian orchards. *Australasian Plant Pathology*, *44*(4), 419–430. <https://doi.org/10.1007/s13313-015-0362-7>
- Kubicek, C. P., Starr, T. L., & Glass, N. L. (2014). Plant cell wall-degrading enzymes and their secretion in plant-pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology*, *52*, 427–451. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-102313-045831>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, *35*(6), 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Lafuente, M. T., Alferez, F., & Gonzalez-Candelas, L. (2018). Light-emitting Diode Blue Light Alters the Ability of *Penicillium digitatum* to Infect Citrus Fruits. *PHOTOCHEMISTRY AND PHOTOBIOLOGY*, *94*(5), 1003–1009. <https://doi.org/10.1111/php.12929>
- Landgraf, A., & Zehr, I. (1982). Inoculum Sources for *Monilinia fructicola* in South Carolina Peach Orchards. *Phytopathology*, *72*, 185–190.
- Lanza, B., & Di Serio, M. G. (2015). SEM characterization of olive (*Olea europaea* L.) fruit epicuticular waxes and epicarp. *Scientia Horticulturae*, *191*, 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.04.033>

- Larena, I., Torres, R., De Cal, A., Liñán, M., Melgarejo, P., Domenichini, P., Bellini, A., Mandrin, J. F., Lichou, J., De Eribe, X. O., & Usall, J. (2005). Biological control of postharvest brown rot (*Monilinia* spp.) of peaches by field applications of *Epicoccum nigrum*. *Biological Control*, *32*(2), 305–310. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCONTROL.2004.10.010>
- Larena, I., Villarino, M., Melgarejo, P., & De Cal, A. (2021). Epidemiological studies of brown rot in spanish cherry orchards in the jerte valley. *Journal of Fungi*, *7*(3). <https://doi.org/10.3390/jof7030203>
- Latinović, J., Latinović, N., & Karaoglanidis, G. S. (2017). First Report of Brown Rot Caused by *Monilinia fructicola* on Nectarine Fruit in Montenegro. *Plant Disease*, *101*(6), 1045. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-16-1601-PDN>
- Lauter, F. R., & Russo, V. E. A. (1991). BLUE-LIGHT INDUCTION OF CONIDIATION-SPECIFIC GENES IN *NEUROSPORA-CRASSA*. *NUCLEIC ACIDS RESEARCH*, *19*(24), 6883–6886. <https://doi.org/10.1093/nar/19.24.6883>
- Lee, M.-H., Chiu, C.-M., Roubtsova, T., Chou, C.-M., & Bostock, R. M. (2010). Overexpression of a Redox-Regulated Cutinase Gene, MfCUT1, Increases Virulence of the Brown Rot Pathogen *Monilinia fructicola* on *Prunus* spp. *Molecular Plant-Microbe Interactions MPMI*, *23*(2), 176–186. <https://doi.org/10.1094/MPMI>
- Lenarčič, T., Albert, I., Böhm, H., Hodnik, V., Pirc, K., Zavec, A. B., Podobnik, M., Pahovnik, D., Žagar, E., Pruitt, R., Greimel, P., Yamaji-Hasegawa, A., Kobayashi, T., Deleu, M., Lins, L., Oecking, C., Feussner, I., Mongrand, S., Anderluh, G., & Nürnberger, T. (2017). Eudicot plant-specific sphingolipids determine host selectivity of microbial NLP cytolysins. *Science*, *358*(6369), 1431–1434. <http://science.sciencemag.org/>
- Liao, H. L., Alferez, F., & Burns, J. K. (2013). Assessment of blue light treatments on citrus postharvest diseases. *Postharvest Biology and Technology*, *81*, 81–88. <https://doi.org/10.1016/J.POSTHARVBIO.2013.02.019>

- Lichou, J., Mandrin, J. F., Breniaux, D., Mercier, V., Giauque, P., Desbrus, D., Blanc, P., & Belluau, E. (2002). Une nouvelle moniliose. *Monilia fructicola* s'attaque aux arbres fruitiers à noyaux. *Phytoma*, *547*, 22–25.
- Linden, H., & Macino, G. (1997). White collar 2, a partner in blue-light signal transduction, controlling expression of light-regulated genes in *Neurospora crassa* candidate for a blue-light photoreceptor in plants been. In *The EMBO Journal* (Vol. 16, Issue 1).
- Liu, X., Li, B. X., Cai, J., Yang, Y., Feng, Y., & Huang, G. (2022). Characterization and necrosis-inducing activity of necrosis- and ethylene-inducing peptide 1-like proteins from *Colletotrichum australisense*, the causative agent of rubber tree anthracnose. *Frontiers in Microbiology*, *13*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.969479>
- López, A., van Kan, J. A. L., Beenen, H. G., Dolcet-Sanjuan, R., Teixidó, N., Torres, R., & Vilanova, L. (2024). Evaluation of cell death-inducing activity of *Monilinia* spp. effectors in several plants using a modified *TRV* expression system. *Frontiers in Plant Science*, *15*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1428613>
- Louise Glass, N., Schmoll, M., Cate, J. H. D., & Coradetti, S. (2013). Plant cell wall deconstruction by ascomycete fungi. *Annual Review of Microbiology*, *67*, 477–498. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092611-150044>
- MAPA. (2023). Anuario de Estadística Agraria 2023. <https://cpage.mpr.gob.es/>
- Marcet-Houben, M., Villarino, M., Vilanova, L., De Cal, A., van Kan, J. A. L., Usall, J., Gabaldón, T., & Torres, R. (2021). Comparative genomics used to predict virulence factors and metabolic genes among *Monilinia* species. *Journal of Fungi*, *7*(6). <https://doi.org/10.3390/jof7060464>
- Martini, C., & Mari, M. (2014). *Monilinia fructicola*, *Monilinia laxa* (*Monilinia* Rot, Brown Rot). In *Postharvest Decay: Control Strategies* (pp. 233–265). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411552-1.00007-7>
- Merhej, J., Urban, M., Dufresne, M., Hammond-Kosack, K. E., Richard-Forget, F., & Barreau, C. (2012). The velvet gene, *FgVe1*, affects fungal development and positively regulates trichothecene biosynthesis and pathogenicity in *Fusarium graminearum*. *Molecular Plant Pathology*, *13*(4), 363–374. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00755.x>

- Michailides, T. J., & Morgan, D. P. (1997). Influence of Fruit-to-Fruit Contact on the Susceptibility of French Prune to Infection by *Monilinia fructicola*.
- Mirdita, M., Schütze, K., Moriwaki, Y., Heo, L., Ovchinnikov, S., & Steinegger, M. (2022). ColabFold: making protein folding accessible to all. *Nature Methods*, *19*(6), 679–682. <https://doi.org/10.1038/s41592-022-01488-1>
- Mooney, J. L., & Yager, L. N. (1990). Light is required for conidiation in *Aspergillus nidulans*. *Genes & Development*, *4*, 1473–1482.
- Müller, N., Leroch, M., Schumacher, J., Zimmer, D., Könnel, A., Klug, K., Leisen, T., Scheuring, D., Sommer, F., Mühlhaus, T., Schroda, M., & Hahn, M. (2018). Investigations on VELVET regulatory mutants confirm the role of host tissue acidification and secretion of proteins in the pathogenesis of *Botrytis cinerea*. *New Phytologist*, *219*(3), 1062–1074. <https://doi.org/10.1111/nph.15221>
- Munda, A., & Viršček Marn, M. (2010). First Report of Brown Rot Caused by *Monilinia fructicola* Affecting Peach Orchards in Slovenia. *Plant Disease*, *94*(9), 1166. <https://doi.org/10.1094/PDIS-94-9-1166A>
- Muramatsu, N., Tanaka, K., Asakura, T., & Haji, T. (2004). Changes in cell wall polysaccharides and physical properties of peach (*Prunus persica* Batsch) fruit during ripening. *JAPAN SOC HORTICULTURAL SCI*, *73*(6), 534–540.
- Naranjo-Ortíz, M. A., Rodríguez-Píres, S., Torres, R., De Cal, A., Usall, J., & Gabaldón, T. (2018). Genome Sequence of the Brown Rot Fungal Pathogen *Monilinia laxa*. *6*, 214–232. <https://doi.org/10.1128/genomeA>
- Niehaus, E. M., Schumacher, J., Burkhardt, I., Rabe, P., Spitzer, E., Münsterkötter, M., Güldener, U., Sieber, C. M. K., Dickschat, J. S., & Tudzynski, B. (2017). The GATA-type transcription factor Csm1 regulates conidiation and secondary metabolism in *Fusarium fujikuroi*. *Frontiers in Microbiology*, *8*(JUN). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.011175>
- Oliveira Lino, L., Pacheco, I., Mercier, V., Faoro, F., Bassi, D., Bornard, I., & Quilot-Turion, B. (2016). Brown Rot Strikes Prunus Fruit: An Ancient Fight Almost Always Lost. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (Vol. 64, Issue 20, pp. 4029–4047). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b00104>

- Ondejkova, N., Hudecova, M., & Bacigalova, K. (2010). First report on *Monilinia fructicola* in the Slovak Republic. *Plant Protection Science*, 46(4), 181–184.
- Ottmann, C., Luberacki, B., Kü, I., Koch, W., Dé Ric Brunner, F., Weyand, M., Mattinen, L., Pirhonen, M., Anderluh, G., Seitz, H. U., Nü Rnberger, T., & Oecking, C. (2009). A common toxin fold mediates microbial attack and plant defense. *PNAS*, 106(25), 10359–10354. www.ebi.ac.uk/dali/
- Paynter, V. A., & Jen, J. J. (1975). Characterization of the Pectic Enzymes from *Monilinia fructicola*. *Biochemie Und Physiologie Der Pflanzen*, 167(3), 219–231. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0015-3796\(17\)30784-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0015-3796(17)30784-9)
- Paysan-Lafosse, T., Blum, M., Chuguransky, S., Grego, T., Pinto, B. L., Salazar, G. A., Bileschi, M. L., Bork, P., Bridge, A., Colwell, L., Gough, J., Haft, D. H., Letunić, I., Marchler-Bauer, A., Mi, H., Natale, D. A., Orengo, C. A., Pandurangan, A. P., Rivoire, C., ... Bateman, A. (2023). InterPro in 2022. *Nucleic Acids Research*, 51(D1), D418–D427. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac993>
- Pellegrino, C., Gullino, M. L., Garibaldi, A., & Spadaro, D. (2009). First Report of Brown Rot of Stone Fruit Caused by *Monilinia fructicola* in Italy. *Plant Disease*, 93(6), 668. <https://doi.org/10.1094/PDIS-93-6-0668A>
- Peñalva, M. A., Tilburn, J., Bignell, E., & Arst, H. N. (2008). Ambient pH gene regulation in fungi: making connections. *Trends in Microbiology*, 16(6), 291–300. <https://doi.org/10.1016/J.TIM.2008.03.006>
- Peraro, M. D., & Van Der Goot, F. G. (2016). Pore-forming toxins: Ancient, but never really out of fashion. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 14, Issue 2, pp. 77–92). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2015.3>
- Pérez-Lara, G., Olivares-Yañez, C., van Bakel, H., Larrondo, L. F., & Canessa, P. (2023). Genome-Wide Characterization of Light-Regulated Gene Expression in *Botrytis cinerea* Reveals Underlying Complex Photobiology. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(10). <https://doi.org/10.3390/ijms24108705>

- Petróczy, M., & Palkovics, L. (2006). First Report of Brown Rot Caused by *Monilinia fructicola* on Imported Peach in Hungary. *Plant Disease*, *90*(3), 375. <https://doi.org/10.1094/PD-90-0375B>
- Phillips, D. J. (1984). Effect of Temperature on *Monilinia fructicola* Conidia Produced on Fresh Stone Fruits. *Plant Disease*, *68*(7), 610–612.
- Pirc, K., Albert, I., Nürnberger, T., & Anderluh, G. (2023). Disruption of plant plasma membrane by Nep1-like proteins in pathogen–plant interactions. In *New Phytologist* (Vol. 237, Issue 3, pp. 746–750). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1111/nph.18524>
- Pirc, K., Clifton, L. A., Yilmaz, N., Saltalamacchia, A., Mally, M., Snoj, T., Žnidaršič, N., Srnko, M., Borišek, J., Parkkila, P., Albert, I., Podobnik, M., Numata, K., Nürnberger, T., Viitala, T., Derganc, J., Magistrato, A., Lakey, J. H., & Anderluh, G. (2022). CELL BIOLOGY An oomycete NLP cytolysin forms transient small pores in lipid membranes. In *Sci. Adv* (Vol. 8). <https://www.science.org>
- PM 7/18 (3) *Monilinia Fructicola*, 50 EPPO Bulletin 5 (2020). <https://doi.org/10.1111/epp.12609>
- Poniatowska, A., Michalecka, M., & Bielenin, A. (2013). Characteristic of *Monilinia* spp. fungi causing brown rot of pome and stone fruits in Poland. *European Journal of Plant Pathology*, *135*(4), 855–865. <https://doi.org/10.1007/s10658-012-0130-2>
- Purschwitz, J., Müller, S., & Fischer, R. (2009). Mapping the interaction sites of *Aspergillus nidulans* phytochrome FphA with the global regulator VeA and the White Collar protein LreB. *Molecular Genetics and Genomics*, *281*(1), 35–42. <https://doi.org/10.1007/s00438-008-0390-x>
- Purschwitz, J., Müller, S., Kastner, C., Schöser, M., Haas, H., Espeso, E. A., Atoui, A., Calvo, A. M., & Fischer, R. (2008). Functional and Physical Interaction of Blue- and Red-Light Sensors in *Aspergillus nidulans*. *Current Biology*, *18*(4), 255–259. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.01.061>
- Qutob, D., Kemmerling, B., Brunner, F., Kufner, I., Engelhardt, S., Gust, A. A., Lubracki, B., Seitz, H. U., Stahl, D., Rauhut, T., Glawischnig, E., Schween, G., Lacombe, B., Watanabe, N., Lam, E., Schlichting, R., Scheel, D., Nau, K., Dodt, G., ... Nürnberger, T. (2006). Phytotoxicity and innate

- immune responses induced by Nep1-like proteins. *Plant Cell*, 18(12), 3721–3744. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.044180>
- R. Hall. (1971). Pathogenicity of *Monilinia fructicola*. *Phytopath. Z*, 72, 281–290.
- Rasiukevičiūtė, N., Brazaitytė, A., Vaštakaitė-Kairienė, V., Kupčinskienė, A., Duchovskis, P., Samuolienė, G., & Valiuškaitė, A. (2021). The effect of monochromatic LED light wavelengths and photoperiods on *Botrytis cinerea*. *Journal of Fungi*, 7(11). <https://doi.org/10.3390/jof7110970>
- Reignault, P., Valette-Collet, O., & Boccara, M. (2008). The importance of fungal pectinolytic enzymes in plant invasion, host adaptability and symptom type. In *European Journal of Plant Pathology* (Vol. 120, Issue 1, pp. 1–11). <https://doi.org/10.1007/s10658-007-9184-y>
- Ridenour, J. B., & Bluhm, B. H. (2018). Crp1 drives pre-penetration infectious development via regulation of Frq1 in the maize pathogen *Cercospora zea-maydis*. *PHYTOPATHOLOGY*, 108(12, S), 8.
- Ridenour, J. B., & Bluhm, B. H. (2019). The White-Collar Complex and FREQUENCY drive pathogenesis in *Cercospora zea-maydis*. *MOLECULAR PLANT-MICROBE INTERACTIONS*, 32(10, S), 50.
- Roberts, A. N., & Yanofsky, C. (1989). GENES EXPRESSED DURING CONIDIATION IN *NEUROSPORA-CRASSA* - CHARACTERIZATION OF CON-8. *NUCLEIC ACIDS RESEARCH*, 17(1), 197–214. <https://doi.org/10.1093/nar/17.1.197>
- Roden, L. C., & Ingle, R. A. (2009). Lights, rhythms, infection: The role of light and the circadian clock in determining the outcome of plant-pathogen interactions. *Plant Cell*, 21(9), 2546–2552. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.069922>
- Rodríguez-Pires, S., Espeso, E. A., Baró-Montel, N., Torres, R., Melgarejo, P., & De Cal, A. (2019). Labeling of *Monilinia fructicola* with GFP and its validation for studies on host-pathogen interactions in stone and pome fruit. *Genes*, 10(12). <https://doi.org/10.3390/genes10121033>
- Rodríguez-Pires, S., Espeso, E. A., Rasiukevičiūtė, N., Melgarejo, P., & De Cal, A. (2021). Light-photoreceptors and proteins related to *Monilinia laxa* photoresponses. *Journal of Fungi*, 7(1), 1–17. <https://doi.org/10.3390/jof7010032>

- Rodríguez-Pires, S., Garcia-Companys, M., Espeso, E. A., Melgarejo, P., & de Cal, A. (2021). Influence of light on the *Monilinia laxa*–stone fruit interaction. *Plant Pathology*, *70*(2), 326–335. <https://doi.org/10.1111/ppa.13294>
- Rodríguez-Pires, S., Melgarejo, P., De Cal, A., & Espeso, E. A. (2020a). Pectin as carbon source for *Monilinia laxa* exoproteome and expression profiles of related genes. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *33*(9), 1116–1128. <https://doi.org/10.1094/MPMI-01-20-0019-R>
- Rodríguez-Pires, S., Melgarejo, P., De Cal, A., & Espeso, E. A. (2020b). Proteomic Studies to Understand the Mechanisms of Peach Tissue Degradation by *Monilinia laxa*. *Frontiers in Plant Science*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01286>
- Roncero, M. I. G., Hera, C., Ruiz-Rubio, M., García Maceira, F. I., Madrid, M. P., Caracuel, Z., Calero, F., Delgado-Jarana, J., Roldán-Rodríguez, R., Martínez-Rocha, A. L., Velasco, C., Roa, J., Martín-Urdiroz, M., Córdoba, D., & Di Pietro, A. (2003). *Fusarium* as a model for studying virulence in soilborne plant pathogens. In *Physiological and Molecular Plant Pathology* (Vol. 62, Issue 2, pp. 87–98). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0885-5765\(03\)00043-2](https://doi.org/10.1016/S0885-5765(03)00043-2)
- Ruger-Herreros, C., Rodríguez-Romero, J., Fernández-Barranco, R., Olmedo, M., Fischer, R., Corrochano, L. M., & Canovas, D. (2011). Regulation of conidiation by light in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, *188*(4), 809–822. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.130096>
- Ruiz-Roldán, M. C., Garre, V., Guarro, J., Mariné, M., & Roncero, M. I. G. (2008). Role of the white collar 1 photoreceptor in carotenogenesis, UV resistance, hydrophobicity, and virulence of *Fusarium oxysporum*. *Eukaryotic Cell*, *7*(7), 1227–1230. <https://doi.org/10.1128/EC.00072-08>
- Rytioja, J., Hildén, K., Yuzon, J., Hatakka, A., de Vries, R. P., & Mäkelä, M. R. (2014). Plant-Polysaccharide-Degrading Enzymes from *Basidiomycetes*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *78*(4), 614–649. <https://doi.org/10.1128/mnbr.00035-14>
- Santhanam, P., Van Esse, H. P., Albert, I., Faino, L., Nürnberger, T., & Thomma, B. P. H. J. (2013). Evidence for functional diversification within

- a fungal Nep1-like protein family. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *26*(3), 278–286. <https://doi.org/10.1094/MPMI-09-12-0222-R>
- Sauer D. B., & Burroughs R. (1986). Disinfection of seed surfaces with sodium hypochlorite. *Phytopathology*, *76*, 745–749.
- Schmittgen, T. D., & Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, *3*(6), 1101–1108. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>
- Schmoll, M. (2018). Regulation of plant cell wall degradation by light in *Trichoderma*. In *Fungal Biology and Biotechnology* (Vol. 5, Issue 1, pp. 1–20). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s40694-018-0052-7>
- Schmoll, M., Tian, C., Sun, J., Tisch, D., & Glass, N. L. (2012). Unravelling the molecular basis for light modulated cellulase gene expression - the role of photoreceptors in *Neurospora crassa*. *BMC Genomics*, *13*(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-127>
- Schumacher, J. (2017). How light affects the life of *Botrytis*. *Fungal Genetics and Biology*, *106*, 26–41. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2017.06.002>
- Schumacher, J., Pradier, J. M., Simon, A., Traeger, S., Moraga, J., Collado, I. G., Viaud, M., & Tudzynski, B. (2012). Natural Variation in the VELVET Gene *bce11* Affects Virulence and Light-Dependent Differentiation in *Botrytis cinerea*. *PLoS ONE*, *7*(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047840>
- Schumacher, J., Simon, A., Cohrs, K. C., Traeger, S., Porquier, A., Dalmais, B., Viaud, M., & Tudzynski, B. (2015). The VELVET complex in the gray mold fungus *Botrytis cinerea*: Impact of BcLAE1 on differentiation, secondary metabolism, and virulence. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *28*(6), 659–674. <https://doi.org/10.1094/MPMI-12-14-0411-R>
- Schumacher, J., & Tudzynski, P. (2012). Morphogenesis and infection in *Botrytis cinerea*. In *Topics in Current Genetics* (Vol. 22, pp. 225–241). https://doi.org/10.1007/978-3-642-22916-9_11
- Schumacher, S., Grosser, K., Voegelé, R. T., Kassemeyer, H. H., & Fuchs, R. (2020). Identification and Characterization of Nep1-Like Proteins From the Grapevine Downy Mildew Pathogen *Plasmopara viticola*. *Frontiers in Plant Science*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00065>

- Schwerdtfeger, C., & Linden, H. (2003). VIVID is a flavoprotein and serves as a fungal blue light photoreceptor for photoadaptation. *EMBO JOURNAL*, *22*(18), 4846–4855. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg451>
- Seidl, M. F., & Van Den Ackerveken, G. (2019). Activity and Phylogenetics of the Broadly Occurring Family of Microbial Nep1-Like Proteins. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082718>
- Sprockett, D. D., Piontkivska, H., & Blackwood, C. B. (2011). Evolutionary analysis of glycosyl hydrolase family 28 (GH28) suggests lineage-specific expansions in necrotrophic fungal pathogens. *Gene*, *479*(1–2), 29–36. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2011.02.009>
- Stinnett, S. M., Espeso, E. A., Cobeño, L., Araújo-Bazán, L., & Calvo, A. M. (2007). *Aspergillus nidulans* VeA subcellular localization is dependent on the importin α carrier and on light. *Molecular Microbiology*, *63*(1), 242–255. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05506.x>
- Sun, P., & Yang, X. B. (2000). Light, Temperature, and Moisture Effects on Apothecium Production of *Sclerotinia sclerotiorum*.
- Swartz, T. E., Tseng, T.-S., Frederickson, M. A., Paris, G., Comerci, D. J., Rajashekara, G., Kim, J.-G., Mudgett, M. B., Splitter, G. A., Ugalde, R. A., Goldbaum, F. A., Briggs, W. R., & Bogomolni, R. A. (2007). Blue-Light-Activated Histidine Kinases: Two-Component Sensors in Bacteria. *Science*, *317*(5841), 1090–1093. <https://doi.org/10.1126/science.1144306>
- Tan, K. K. (1975). Recovery from the blue-light inhibition of sporulation in *Botrytis cinerea*. *Transactions of the British Mycological Society*, *64*(2), 223–228. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(75\)80106-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0007-1536(75)80106-9)
- Teufel, F., Almagro Armenteros, J. J., Johansen, A. R., Gíslason, M. H., Pihl, S. I., Tsirigos, K. D., Winther, O., Brunak, S., von Heijne, G., & Nielsen, H. (2022). SignalP 6.0 predicts all five types of signal peptides using protein language models. *Nature Biotechnology*, *40*(7), 1023–1025. <https://doi.org/10.1038/s41587-021-01156-3>
- Tian, S. P., & Bertolini, P. (1999). Effect of Temperature During Conidial Formation of *Monilinia laxa* on Conidial Size, Germination and Infection of Stored Nectarines. *Journal of Phytopathology*, *147*(11–12), 635–641. <https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1439-0434.1999.00440.x>

- Tisch, D., Kubicek, C. P., & Schmoll, M. (2011). The phosducin-like protein PhLP1 impacts regulation of glycoside hydrolases and light response in *Trichoderma reesei*. *BMC Genomics*, *12*. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-613>
- Tisch, D., & Schmoll, M. (2010). Light regulation of metabolic pathways in fungi. In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 85, Issue 5, pp. 1259–1277). <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2320-1>
- Trzaska, W. J., Wrigley, H. E., Thwaite, J. E., & May, R. C. (2017). Species-specific antifungal activity of blue light. *Scientific Reports*, *7*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05000-0>
- Usall, J., Casals, C., Sisquella, M., Palou, L., & De Cal, A. (2015). Alternative technologies to control postharvest diseases of stone fruits. *Stewart Postharvest Review*, *11*(4). <https://doi.org/10.2212/spr.2015.4.2>
- Uysal, A., Kinay-Teksür, P., & Poyraz, D. (2019). First report of brown rot caused by *Monilinia fructicola* (Winter) Honey on sweet cherry in Turkey. In *Journal of Plant Pathology* (Vol. 101, Issue 3, p. 773). Springer. <https://doi.org/10.1007/s42161-019-00241-6>
- Valette-Collet, O., Cimerman, A., Reignault, P., Levis, C., & Boccara, M. (2003). Disruption of *Botrytis cinerea* Pectin Methylesterase Gene *Bcpme1* Reduces Virulence on Several Host Plants. In *Molecular Plant-Microbe Interactions MPMI* (Vol. 16, Issue 4).
- Varadi, M., Anyango, S., Deshpande, M., Nair, S., Natassia, C., Yordanova, G., Yuan, D., Stroe, O., Wood, G., Laydon, A., Zidek, A., Green, T., Tunyasuvunakool, K., Petersen, S., Jumper, J., Clancy, E., Green, R., Vora, A., Lutfi, M., ... Velankar, S. (2022). AlphaFold Protein Structure Database: Massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic Acids Research*, *50*(D1), D439–D444. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1061>
- Verde-Yáñez, L., Vall-llaura, N., Usall, J., Teixidó, N., & Torres, R. (2022). Phenotypic plasticity of *Monilinia* spp. in response to light wavelengths: From in vitro development to virulence on nectarines. *International Journal of Food Microbiology*, *373*. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109700>

- Vilanova, L., López-Pérez, M., Ballester, A. R., Teixidó, N., Usall, J., Lara, I., Viñas, I., Torres, R., & González-Candelas, L. (2018). Differential contribution of the two major polygalacturonases from *Penicillium digitatum* to virulence towards citrus fruit. *International Journal of Food Microbiology*, *282*, 16–23. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.05.031>
- Vilanova, L., Valero-Jiménez, C. A., & van Kan, J. A. L. (2021). Deciphering the *Monilinia fructicola* genome to discover effector genes possibly involved in virulence. *Genes*, *12*(4). <https://doi.org/10.3390/genes12040568>
- Villarino, M., Egüen, B., Lamarca, N., Segarra, J., Usall, J., Melgarejo, P., & De Cal, A. (2013). Occurrence of *Monilinia laxa* and *M. fructigena* after introduction of *M. fructicola* in peach orchards in Spain. *European Journal of Plant Pathology*, *137*(4), 835–845. <https://doi.org/10.1007/s10658-013-0292-6>
- Villarino, M., Melgarejo, P., & De Cal, A. (2016). Growth and aggressiveness factors affecting *Monilinia* spp. survival peaches. *International Journal of Food Microbiology*, *224*, 22–27. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.02.011>
- Villarino, M., Melgarejo, P., Usall, J., Segarra, J., & De Cal, A. (2010). Primary inoculum sources of *Monilinia* spp. in Spanish peach orchards and their relative importance in brown rot. *Plant Disease*, *94*(8), 1048–1054. <https://doi.org/10.1094/PDIS-94-8-1048>
- Villarino, M., Melgarejo, P., Usall, J., Segarra, J., Lamarca, N., & de Cal, A. (2012). Secondary inoculum dynamics of *Monilinia* spp. and relationship to the incidence of postharvest brown rot in peaches and the weather conditions during the growing season. *European Journal of Plant Pathology*, *133*(3), 585–598. <https://doi.org/10.1007/s10658-011-9931-y>
- Villarino, M., Rodríguez-Pires, S., Requena, E., Melgarejo, P., De Cal, A., & Espeso, E. A. (2022). A Secondary Metabolism Pathway Involved in the Production of a Putative Toxin Is Expressed at Early Stage of *Monilinia laxa* Infection. *Frontiers in Plant Science*, *13*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.818483>
- Villarino, M., Usall, J., Casals, C., Lamarca, N., Melgarejo, P., De Cal, A., & Segarra, J. (2022). Development of brown rot epidemics in Spanish peach

- orchards. *European Journal of Plant Pathology*, 163(3), 641–655. <https://doi.org/10.1007/s10658-022-02504-y>
- Wang, G. Y., Michailides, T. J., Hammock, B. D., Lee, Y. M., & Bostock, R. M. (2000). Affinity Purification and Characterization of a Cutinase from the Fungal Plant Pathogen *Monilinia fructicola* (Wint.) Honey. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 382(1), 31–38. <https://doi.org/10.1006/ABBI.2000.1995>
- Wang, J. R., Guo, L. Y., Xiao, C. L., & Zhu, X. Q. (2018). Detection and identification of six monilinia spp. Causing brown rot using taqman real-time pcr from pure cultures and infected apple fruit. *Plant Disease*, 102(8), 1527–1533. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-17-1662-RE>
- Weaver, L. (1950). Effect Of Temperature and Relative Humidity on Occurrence of Blossom Blight of Stone Fruits. *PHYTOPATHOLOGY*, 40(12), 1136–1153.
- Wu, Y., Xu, L., Yin, Z., Dai, Q., Gao, X., Feng, H., Voegelé, R. T., & Huang, L. (2018). Two members of the velvet family, VmVeA and VmVelB, affect conidiation, virulence and pectinase expression in *Valsa mali*. *Molecular Plant Pathology*, 19(7), 1639–1651. <https://doi.org/10.1111/mpp.12645>
- XU, H., FU, Y. nan, LI, T. lai, & WANG, R. (2017). Effects of different LED light wavelengths on the resistance of tomato against *Botrytis cinerea* and the corresponding physiological mechanisms. *Journal of Integrative Agriculture*, 16(1), 106–114. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(16\)61435-1](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(16)61435-1)
- Xu, X. M., Bertone, C., & Berrie, A. (2007). Effects of wounding, fruit age and wetness duration on the development of cherry brown rot in the UK. *Plant Pathology*, 56(1), 114–119. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2006.01502.x>
- Xu, X.-M., Guerin, L., & Robinson, J. D. (2001). Effects of temperature and relative humidity on conidial germination and viability, colonization and sporulation of *Monilinia fructigena*. In *Plant Pathology* (Vol. 50).
- Yadav, K., Dwivedi, S., Gupta, S., Tanveer, A., Yadav, S., Yadav, P. K., Anand, G., & Yadav, D. (2023). Recent insights into microbial pectin lyases: A review. In *Process Biochemistry* (Vol. 134, pp. 199–217). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2023.10.008>

- Yang, C., Li, W., Huang, X., Tang, X., Qin, L., Liu, Y., Xia, Y., Peng, Z., & Xia, S. (2022). SsNEP2 Contributes to the Virulence of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Pathogens*, 11(4).
<https://doi.org/10.3390/pathogens11040446>
- Yang, Y., Zhang, Y., Li, B., Yang, X., Dong, Y., & Qiu, D. (2018). A *Verticillium dahliae* pectate lyase induces plant immune responses and contributes to virulence. *Frontiers in Plant Science*, 9.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01271>
- Yash Gupta, Y. G., & Agarwala, R. K. (1991). Effect of temperature on growth and infection of peach by *Monilinia laxa*. 6(1), 76–79.
- Yung, Y. L. (2003). An introduction to atmospheric radiation. By K. N. Liou. Academic Press. Second edition, 2002. pp. xiv+583. ISBN 0 12 451451 0. *Quarterly Journal of the Royal Meteorological Society*, 129(590), 1741.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1256/003590003102695746>
- Zhang, T., Sun, X., Xu, Q., Candelas, L. G., & Li, H. (2013). The pH signaling transcription factor PacC is required for full virulence in *Penicillium digitatum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(20), 9087–9098.
<https://doi.org/10.1007/s00253-013-5129-x>
- Zheng, J., Ge, Q., Yan, Y., Zhang, X., Huang, L., & Yin, Y. (2023). DbCAN3: Automated carbohydrate-Active enzyme and substrate annotation. *Nucleic Acids Research*, 51(W1), W115–W121.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkad328>
- Zhu, P., Zhang, C., Xiao, H., Wang, Y., Toyoda, H., & Xu, L. (2013). Exploitable Regulatory Effects of Light on Growth and Development of *Botrytis cinerea*. *JOURNAL OF PLANT PATHOLOGY*, 95(3), 509–517.
- Zubieta Hernandez, H. 2022. Caracterización y Aislamiento de Microconidias de *Monilinia fructicola*. TFM, Universidad Complutense de Madrid.

Anexos

Tabla S4.1. Genes expresados diferencialmente compartidos entre las muestras de 5 minutos y 14 horas de iluminación.

Upregulated genes		Downregulated genes	
Protein ID	Annotation	Protein ID	Annotation
MFRU_003g00560	pn11	MFRU_003g05160	hypothetical protein MFRU_003g05160
MFRU_021g00620	far1	MFRU_028g00860	Oxidoreductases
MFRU_008g01270	HAD-superfamily class IIA hydrolase	MFRU_053g00330	Oxidoreductases
MFRU_003g04280	Unknown function	MFRU_036g00470	putative exo-beta glucanase protein
MFRU_002g03330	beta-sandwich domain of Sec23/24	MFRU_006g02210	Acting on a peroxide as acceptor
MFRU_071g00010	Choline dehydrogenase	MFRU_028g00160	putative epl1 protein
MFRU_005g02620	SUR7	MFRU_008g03590	Translocases
MFRU_003g01680	Cinnamyl alcohol dehydrogenases (CAD)	MFRU_032g00410	putative cnd3 protein
MFRU_031g00840	Taurine catabolism dioxygenase TauD	MFRU_050g00430	putative multicopper oxidase protein
MFRU_005g04180	Unknown function		
MFRU_071g00130	Unknown function		
MFRU_014g01250	Unknown function		
MFRU_063g00080	Taurine catabolism dioxygenase TauD		
MFRU_004g03450	Heat shock protein 9/12		
MFRU_008g00380	Unknown function		
MFRU_005g01380	Major Facilitator Superfamily		
MFRU_019g00940	pg6		
MFRU_028g01080	Lactonase, 7-bladed		
MFRU_037g00110	putative magnesium ion transporter protein		
MFRU_003g02440	cell1		
MFRU_013g00700	Unknown function		
MFRU_012g02510	putative alkyl hydroperoxide reductase subunit c		
MFRU_031g01060	putative xenobiotic compound family protein		
MFRU_009g02400	putative zinc-binding dehydrogenase protein		
MFRU_012g01220	putative histidine acid phosphatase protein		
MFRU_029g00280	D-threo-aldose 1-dehydrogenase		
MFRU_004g04290	Unknown function		
MFRU_002g03840	Unknown function		
MFRU_003g00720	Transferring one-carbon groups		
MFRU_024g00750	putative integral membrane protein		

MFRU_010g02220	Oxidoreductases
MFRU_036g00130	Acting on ester bonds
MFRU_019g01430	putative major royal jelly protein

Tabla S4.2. Valores de expresión génica diferencial obtenidos por RNAseq en *M. fructigena* Mgen6 de un grupo de CWDEs importante para el desarrollo de la patogénesis en *Monilinia* spp.

Gene Name	CAZyme family	Seq ID	5 minutes				14 hours			
			Mean TPM 58W	Mean TPM darkness	Log ₂ FC	FDR p-value	Mean TPM 58W	Mean TPM darkness	Log ₂ FC	FDR p-value
cel1	GH	g4625.t1	65,07	1,18	5,66	4,33E-26	2,08	4,35	-0,54	0,68
cut1	CE	g14.t1	15,02	11,15	0,41	0,80	7,29	15,39	-1,11	0,04
pg1	GH	g9059.t1	1537,29	80,34	4,31	4,87E-16	28,48	213,61	-1,53	0,04
pg2	GH	g6856.t1	34,99	10,54	2,70	0,05	2,22	23,81	-3,46	6,74E-12
pg3	GH	g1036.t1	24,31	16,93	0,40	0,73	11,48	23,31	-1,05	0,03
pme3	CE	g9060.t1	587,59	67,40	3,05	1,27E-21	47,21	109,23	-0,65	0,37
pme2	CE	g1597.t1	113,95	7,58	3,82	3,68E-23	6,88	24,05	-0,51	0,67
pn1	PL	g5602.t1	2,38	3,73	-0,60	0,73	2,91	1,65	0,75	0,46
pn2	PL	g2019.t1	286,74	2,04	7,80	7,44E-53	0,14	42,02	-7,94	7,12E-14
pel1	PL	g6148.t1	11,30	14,93	-0,48	0,62	10,94	12,36	-0,20	0,80
pel2	PL	g3424.t1	1,72	2,08	-0,42	0,85	1,41	0,76	0,86	0,53
pel3	PL	g6198.t1	5,19	6,13	-0,37	0,85	5,23	8,45	-0,79	0,24
rha1	GH	g5755.t1	62,86	48,48	0,28	0,70	68,73	59,91	0,11	0,87
rha2	GH	g6185.t1	11,15	15,60	-0,57	0,57	14,80	9,35	0,64	0,17
rha5	GH	g350.t1	17,13	5,32	1,62	2,15E-03	2,99	4,75	-0,70	0,25
rha6	GH	g5923.t1	12,17	13,08	-0,20	0,90	13,93	15,71	-0,28	0,64
rgae1	CE	g4360.t1	18,33	5,33	1,69	0,01	9,36	6,22	0,52	0,48
rgae2	CE	g1033.t1	27,12	14,42	1,02	0,16	3,87	10,43	-1,52	7,06E-03
nep2	-	g1541.t1	400,37	61,93	2,64	4,03E-19	205,23	146,44	0,62	0,34

Tabla S4.3. Valores de expresión génica diferencial obtenidos por RNAseq en *M. fructigena* Mgena6 de los genes potencialmente implicados en la respuesta a luz.

Gene Name	Seq ID	5 minutes				14 hours			
		Mean TPM 58W	Mean TPM darkness	Log ₂ FC	FDR p-value	Mean TPM 58W	Mean TPM darkness	Log ₂ FC	FDR p-value
cry1	g8216.t1	61,50	13,01	2,12	2,49E-11	35,89	26,72	0,40	0,43
cry2	g881.t1	17,96	1,23	3,75	8,24E-19	4,58	0,51	3,06	2,29E-06
wcl1	g1542.t1	51,24	46,77	0,01	0,99	31,47	40,55	-0,33	0,58
wcl2	g7951.t1	60,75	42,55	0,40	0,46	35,32	34,29	-0,01	0,99
vvd1	g9378.t1	231,67	6,16	5,34	5,27E-42	42,27	4,11	3,27	3,34E-12
lov3	g9073.t1	199,85	39,77	2,30	9,23E-10	23,40	14,15	0,73	0,10
lov4	g3328.t1	26,60	1,97	3,77	5,30E-14	1,14	0,45	2,34	0,26
op1	g8105.t1	403,16	483,59	-0,15	0,91	240,07	569,90	-1,28	1,46E-04
op2	g2643.t1	0,35	0,77	-1,29	0,57	3,97	0,93	2,08	0,01
phy1	g1853.t1	33,89	23,43	0,41	0,18	26,60	22,26	0,27	0,65
phy2	g5635.t1	138,30	54,57	1,27	2,05E-04	61,59	31,15	0,96	0,01
phy3	g4438.t1	26,40	14,30	1,83	0,04	16,67	19,07	-1,17	0,47
vel1	g5077.t1	220,32	138,85	0,55	0,24	114,29	100,45	1,05	0,86
vel2	g2938.t1	448,26	162,75	1,39	1,07E-04	129,63	76,57	0,66	0,18
vel3	g8652.t1	13,00	3,20	2,00	9,60E-04	2,47	5,58	-1,16	0,06
vel4	g3834.t1	73,33	86,51	-0,35	0,58	61,97	72,51	-0,28	0,62
laeA	g8911.t1	79,93	36,76	1,01	0,03	15,72	20,04	-0,35	0,62
frq1	g8931.t1	522,32	89,52	2,47	4,42E-06	35,66	61,37	-0,79	0,07
far1	g2044.t1	604,42	505,81	0,17	0,89	625,04	597,38	0,07	0,94

A.1. Astacio, J.D.; Espeso, E.A.; Melgarejo, P.; De Cal, A. *Monilinia fructicola* Response to White Light. *J. Fungi* **2023**, *9*, 988.

<https://doi.org/10.3390/jof9100988>

A.2. Astacio, J.D.; Melgarejo, P.; De Cal, A.; Espeso, E.A. *Monilinia fructicola* genes involved in the cell wall-degrading process in early nectarine infection. *International Journal of Food Microbiology* **2024**, *419*, 110750.

<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2024.110750>.

A.1.

Article

Monilinia fructicola response to white light

Astacio, J.D.^{1,2}, Espeso, E.A.³, Melgarejo, P.¹ and De Cal, A.^{1*}

¹ Grupo de Hongos Fitopatógenos, Departamento de Protección Vegetal, Centro Nacional INIA-CSIC, Madrid, Spain.

² Programa Biotecnología y Recursos Genéticos de Plantas y Microorganismos Asociados. ETSIA. UPM, Madrid, Spain.

³ Laboratorio de Biología Celular de Aspergillus, Centro Investigaciones Biológicas Margarita Salas, CSIC (CIB-CSIC), Departamento de Biología Celular y Molecular, Madrid, Spain

* Correspondence: cal@inia.csic.es

Abstract: Light represents a powerful signal for the regulation of virulence in many microbial pathogens. *Monilinia fructicola* is the most virulent species causing brown rot in stone fruit crops. To understand the influence of light on *M. fructicola*, we measured the effect of white light and photoperiods on the colonial growth and sporulation of the model *M. fructicola* strain 38C on solid cultures. Searches in *M. fructicola* 38C genome predicted a complete set of genes coding for photoreceptors possibly involved in perception of all ranges of wavelengths. Since white light had an obvious negative effect on vegetative growth and asexual development of *M. fructicola* 38C on potato dextrose agar, we studied how light influences on photoreceptor genes in *M. fructicola* during early peach infection and in liquid culture. The transcriptomes were analyzed in “Red Jim” nectarines infected by *M. fructicola* 38C and subjected to light pulses for 5 min and 14 h after 24 h of incubation in darkness. Specific light induced genes were identified. Among these, we confirmed in samples from infected fruit or synthetic media that blue-light photoreceptor VIVID1 was among the highest expressed genes. An unknown gene, *far1*, coding for a small protein conserved in many families of Ascomycota phylum, was also highly induced in light. In contrast, a range of well-known photoreceptors displayed a low transcriptional response to light in *M. fructicola* from nectarines but not on the pathogen mycelium growing in liquid culture media for 6 days.

Citation: To be added by editorial staff during production.

Academic Editor: Firstname Last-name

Received: date

Revised: date

Accepted: date

Published: date



Copyright: © 2023 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Keywords: Brown rot; *vivid1*; transcriptional regulation; sporulation; photoreception.

1. Introduction

Brown rot is a fungal disease affecting stone and pome fruit crops worldwide, caused mainly by three species of the genus *Monilinia* spp [1], *Monilinia fructicola* (G. Winter), *Monilinia fructigena* (Honey) and *Monilinia laxa* (Aderhold and Ruhland). However, *M. fructicola* has a higher growth and aggressiveness than *M. laxa* and *M. fructigena*, which may be the cause of the displacement of both species on stone fruit orchards [2]. In our laboratory strain 38C has been largely used as a model to understand peach infection by *M. fructicola* [3].

M. fructicola, belonging to the Sclerotiniaceae family, has a necrotrophic lifestyle, as it colonizes plant cell tissue and cause cell death in order to obtain nutrients [1]. *M. fructicola* infection process can be divided into three phases: pre-penetration, penetration and colonization. Infection begins when *M. fructicola* conidia germinate on fruit surface to produce germ tubes and/or appressoria, which then penetrate through fruit surface depending on

the prevailing environmental conditions [3], and degree of maturity of fruit [4]. Temperature affects the production of germ tubes or appressoria by *M. fructicola* after conidial germination [4]. *M. fructicola* produces the same number of germ tubes or appressoria at 4 °C, while produces more germ tubes than appressoria at temperatures higher than 10 °C. Negligible or no germination of *M. fructicola* conidia occurs at 60% RH [4]. However, the effect of light on these early pre-penetration stages of *M. fructicola* is unknown.

Light has been identified as another important environmental factor in the development of plant diseases [5;6], affecting both the host response and the pathogen virulence. Light drives adaptive responses in fungi, which actively sense their environment in order to activate protective mechanisms against light-associated stress and to regulate many facets of their development, like carotenogenesis and conidiation [7], secondary metabolism [8] and the balance between sexual and asexual development [9]. Behind this regulation of cell development there is a sophisticated light signaling machinery, which is composed of different apoproteins in association with chromophores [10]. These complexes, named photoreceptors, react to light of a determined wavelength through absorption of a photon that promotes structural changes in the chromophore, which in turn induce conformational changes in the apoprotein [11]. There are several families of photoreceptors depending on the chromophore they harbor and the wavelength they are sensitive to: near-UV/blue light-sensing cryptochromes (CRYs, 350-500nm), blue light-sensing LOVs (light, oxygen, voltage) domain containing proteins (450nm), green light-sensing opsins (OPs, 540nm), and phytochromes which detect red/far red ratio (650-780nm) [11].

Recent genomic studies in *M. laxa* suggest that the photoreceptors arsenal [12] is similar to those described in the well-known pathogen *B. cinerea* [13], which also belongs to the Sclerotiniaceae family. A unique ortholog for each photoreceptor with a highly conserved domain architecture was identified in *M. laxa* [12]. *M. laxa* has proven to be a light-responsive plant pathogen since different light conditions, intensities and photoperiods affect its transcriptional profile, phenotype, growth and conidiation rate [14;15]. Light also affects the development of brown rot caused by *M. laxa* on nectarines and cherries [15]. In this study, we focused on determining whether the model for *M. fructicola* infection in peaches, strain 38C, would be able to perceive the presence or absence of light, by identifying the completeness of photoreceptors machinery, which genes are under light regulation when the fungus is cultured on fruit in early pre-penetration stages or synthetic media, and how exposure to light influences the growth of this fungal plant pathogen.

2. Materials and Methods

2.1 *Monilinia fructicola* strains

Single-spore isolate from *M. fructicola*, 38C is stored at the culture collection of the Plant Protection Department of INIA-CSIC (Madrid, Spain). From the same collection, we chose strain 1C as a control on solid cultures. The genome from *M. fructicola* 38C is sequenced and available at NCBI under the accession number GCA_016906325.1 (BioProject PRJNA503180) [16]. Isolates were maintained as cultures on Potato Dextrose Agar (PDA Difco™, New Jersey, USA), in darkness at 4°C for short-term storage and as a conidial suspension in 20% glycerol at -80°C for long-term storage. For conidia production, isolates were cultured on PDA at 25°C for 7 days in continuous darkness.

2.2 Effect of different lights on mycelial growth and sporulation of *M. fructicola* on PDA

Effect of white light generated using a set of fluorescent bulbs of Osram36W/954 “day-light” on the growth rate and conidia production was evaluated for *M. fructicola* strains

1C and 38C. These bulbs produce an irradiance of 110.13 W m^{-2} , a luminous flux of 2,850 lm, illuminance of 8,700 lux, and have a wavelength range between 300-700 nm, with a maximum around 550 nm (supplementary figure 1). Petri dishes filled with PDA were inoculated in the center with a $15 \mu\text{l}$ droplet of a suspension containing 10^6 conidia ml^{-1} and cultivated for 7 days in growth chambers at 22-25°C under two different photoperiods: 8h light / 16h darkness and 12h light / 12h darkness. Distance between light bulbs and samples was set to 25 cm and control groups were set in continuous darkness. Two perpendicular diameters were measured starting on the third day of incubation until the end of the experiment, and daily growth speed (diameter in mm day^{-1}) was calculated using regression analysis from the average measurements of each colony diameter. Total sporulation was calculated at the end of each assay and then referenced to each colony growth area. In order to do so, the surface of each plate was individually scraped after adding 5 ml of sterilized distilled water and filtered through glass wool to remove the mycelia. The number of conidia produced was counted using a hemocytometer. Data were expressed as total conidia divided by the colony area (cm^2). Five technical replicates were used for each condition and the whole experiment was repeated twice.

2.3 Effect of different lights on gene expression levels of *M. fructicola* in PDB

Influence of white light generated using a set of fluorescent bulbs of Osram 58W/840 "Cool White" was also tested. These bulbs produce an irradiance of 165.55 W m^{-2} , a luminous flux of 5,200 lm, illuminance of 14,900 lux, and have a wavelength range between 300-700nm, with a maximum around 520nm (supplementary figure 1). Flasks containing 100 ml of Potato Dextrose Broth (PDB, Difco™, New Jersey, USA) were inoculated with conidia from *M. fructicola* 38C and grown in darkness at 25°C for 6 days to allow for mycelial growth. Lights were turned on and samples were taken at 5 minutes, 1 h, 2.5 h 5 h and 14 h of uninterrupted illumination. Distance between light bulbs and samples was set to 25 cm and control groups were set in continuous darkness. Mycelium was then collected by filtering the culture through miracloth and immediately frozen in liquid nitrogen. Flasks maintained in darkness were used as control. Three biological replicates were used in each condition, and complete experiment was repeated twice.

2.4 Effect of different lights on nectarine brown rot disease

Nectarines (var. Red Jim) from Ebro valley (Lleida, Spain), harvested at optimal commercial maturity on the first weeks of August were used. Surface of nectarines were disinfected using the hypochlorite procedure [17]. Afterwards, nectarines were prepared for infection experiments being dried in a laminar flow cabinet and then each nectarine was inoculated with three drops of $15 \mu\text{l}$ of a suspension containing 10^6 conidia ml^{-1} from *M. fructicola* 38C. Inoculated fruit were placed on sterilized cellulose alveoli inside disinfected plastic containers lined up with soaked paper to maintain humidity. Each container was individually sealed with plastic film and incubated in the dark for 24h at 22°C and 100% HR to allow conidial germination and germ tube formation [4]. Next, lights were turned on and fruit tissue samples with germinated conidia were taken at 5 minutes, 1 h, 2.5 h, 5 h, and 14 h of continuous illumination. Inoculated fruit maintained in darkness were used as control. After each incubation time, samples of peel and pulp tissues of 1 cm diameter encompassing the inoculation sites were collected from three individual fruit (three biological replicates) per condition. All samples were frozen in liquid nitrogen before being kept at -80°C until further transcriptional profiling analysis.

2.5 RNA extraction

Total RNA of *M. fructicola* 38C was extracted from infected fruit tissues according to the rapid CTAB-based protocol [18] adapted to *Monilinia* spp [12]. Total RNA was resuspended in RNase free Mili-Q water and frozen immediately at -80°C until further use.

When using mycelium from PDB as source for RNA extraction, a TRIreagent based method was used (Sigma–Aldrich, St Louis, MO, USA) as previously described [19]. Total RNA was resuspended in RNase free MiliQ water and frozen immediately until further use.

In both cases, RNA concentration and purity were measured using a NanoDrop 2000 spectrophotometer, and RNA integrity was checked by 1.2% agarose gel electrophoresis.

2.6 Identification of photoreceptor coding genes in *M. fructicola* 38C genome

The blast tool from NCBI Genomic workbench (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/gbench/>) was used to identify a list of putative photoreceptor coding genes and light response genes, described in *M. laxa* [12], in the available 38C genome and proteome prediction.

2.7 Transcriptomic analysis

RNA samples from nectarines infected by *M. fructicola* 38C, from the same Osram 58W/840 “Cool White” as before, and darkness at 5 minutes and 14 hours post irradiance (pi) were sequenced using Illumina technology by MacroGen facilities. RawData files in .fastq format were generated containing 150pb reads. These reads were trimmed and mapped against available *Monilinia* spp. genomes using CLC Genomics Workbench 22.0.3 [20] software and differential expression analysis were carried out between with the light and darkness in both time stamps. A transcript was considered to be differentially expressed when it had a logFC lower or higher than -2/2 respectively and a RPKM value higher than 20 in at least one condition.

Gene Ontology and functional annotation analysis were performed using OmicsBox software [21]. GO enrichment analyses were also carried out using the “Gene Set Test” tool in CLC Genomics Workbench (QIAGEN CLC Genomics Workbench 22.0.3 [20]). Filtering parameters to define a differentially expressed gene (DEG) were an RPKM value above 20 and a p-value < 0.05.

2.8 Gene expression analysis

Before cDNA synthesis, total RNA samples from 38C were treated with DNase I (Invitrogen, Carlsbad, USA) following manufacturer’s instructions. cDNA was synthesized from 1µg of DNase- treated RNA using SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR and oligo(dT) primer (Invitrogen, Carlsbad, USA) following manufacturer’s indications. Real-time PCR was performed with a 7500 Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems, Foster City, USA) using GoTaq qPCR Master Mix (Promega, Madison, USA). Three technical replicates were analyzed for each biological replicate for both target and housekeeping genes, with a total volume of 20 µl, containing 10 µl of 2× GoTaq qPCR Master Mix, 7.8 µl of nuclease-free water, 300 nM of each primer and 100 ng of cDNA. The cycling program was 2 min at 95°C, followed by 40 cycles of 15 s at 95°C and 1 min at 60°C. After the amplification reaction, a melt curve analysis was performed to check the specificity. Primers (oligonucleotides listed in supplementary Table 1) for histone H3 gene (MI_histoneH3) (BK012065) were used from Rodríguez-Pires et al., (2020b). Primers for *vivid1* (*vvd1*), *far1*, phytochrome 1 and 2 (*phy1* and *phy2*), opsine1 and 2 (*op1* and *op2*), cryptochrome 1 and 2 (*cry1and cry2*) and velvet 2 and 4 (*vel2* and *vel4*) genes (gene codes are in

Table 1) were designed using Vector NTI (Thermo Fisher, Waltham, USA) and MEGA X [22].

2.9 Statistical analysis

Data were analyzed by ANOVA analysis. When F-test was significant at $p \leq 0.05$, the means were compared using Tukey's multiple test range.

Gene expression levels were calculated using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method [23].

3. Results

3.1 Effect of light on growth rate and sporulation of *M. fructicola*

Strain 38C has previously been used to study the infection process on peach by *M. fructicola*. Strain 38C was subjected to different conditions of light exposure to determine possible effects of light on its colony phenotype. As a control, *M. fructicola* strain 1C was used for comparison. Strains 1C and 38C showed differences in colony development when exposed to light. Strain 38C grew faster than strain 1C in every condition tested (Figure 1).

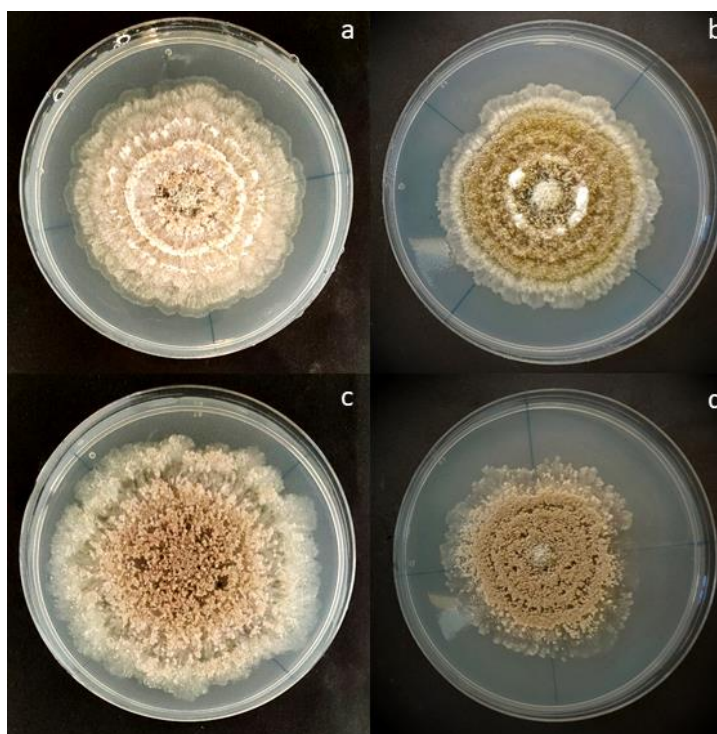


Figure 1. Effect of white light on two *M. fructicola* strains after seven days of incubation: (a) strain 38C exposed to a 12h white light photoperiod; (b) strain 1C exposed to a 12h white light photoperiod; (c) strain 38C exposed to continuous darkness; (d) strain 1C exposed to continuous darkness.

Since photoperiods are important on fungal growth [12], in order to quantify the effect of white light or darkness on the growth and conidiation rates of *M. fructicola*, we tested two different photoperiods, with 8 and 12 h of light each one. Growth speed of both *M. fructicola* isolates was affected by the 12 h of light photoperiod. The 8 h of light photoperiod only had a significant effect on the growth rate of isolate 38C (Figure 2 A and B). However, the effect of light on sporulation of both isolates was different (Figure 2 C and D). Sporulation of 38C was reduced by two photoperiods, with further reduction at 12 h of light photoperiod. Meanwhile, light did not have any effect on the sporulation of 1C. These data indicated that our model strain 38C might differentially respond to light.

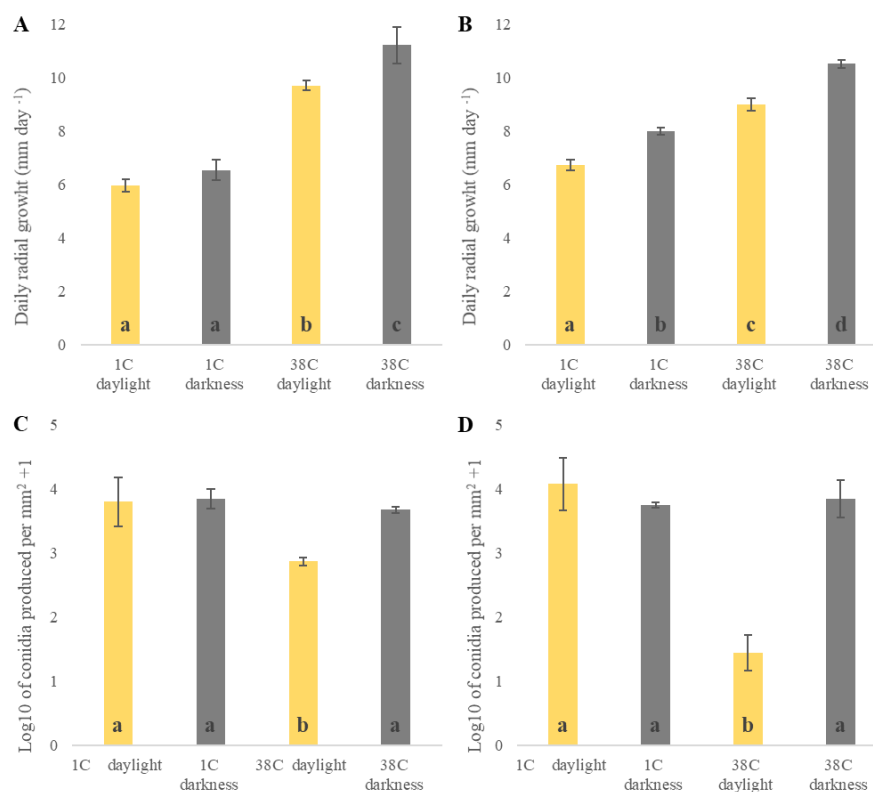


Figure 2. Effect of two different white light photoperiods on mycelial growth rate and sporulation of two strains of *M. fructicola*, 38C and 1C, after seven days of incubation: (A) mycelial growth rate under 8h light photoperiod; (B) mycelial growth rate under 12h light photoperiod; (C) sporulation under 8h light photoperiod; (D) sporulation under 12h light photoperiod. Data is the average and standard deviation from two completed assays with five technical replicates each one. Bars with same letter in each graph were not significantly different by Tukey's multiple test range.

3.2 Light sensing machinery in *M. fructicola* 38C.

Fourteen genes encoding putative light sensing and photoresponse related (photoreceptors) proteins (listed in Table 1) were identified in *M. fructicola* 38C genome after BLASTP searches using NCBI Genomic Workbench and available genomic data from *B. cinerea* strain B05.10 and *M. laxa* strain 8L, together with the predicted proteome of *M. fructicola* 38C. Deduced protein sequences showed shared and well-conserved domains with those on *B. cinerea* and *M. laxa* (Tables 1 and 2).

Table 1. Photoreception related proteins presented in *M. fructicola* 38C and homology of their conserved domains in *B. cinerea* and *M. laxa*. ^a Protein unique identifier in 38C predicted proteome. ^b Putative protein function based on functional annotation. ^c Predicted protein length in 38C proteome ^d Gene unique identifier in *M. laxa* 8L genome; BLASTP identity and coverage. ^e Gene unique identifier in *Botrytis cinerea* B05.10 genome; BLASTP coverage and BLASTP identity.

Gene name	Seq ID ^a	Putative protein function ^b	Predicted protein length ^c	<i>M. laxa</i> 8L ID ^d	% Identity	% Coverage	<i>B. cinerea</i> B05.10 Id ^e	% Identity	% Coverage
Putative near-UV/blue light sensors									
Mfcrcy1	MFRU_030g01000	putative deoxyribodipyrimidine photo-lyase	646	MICRY1	92.01	89.54	Bccry1	77.28	99.15
Mfcrcy2	MFRU_004g02180	DASH family cryptochrome protein	684	MICRY2	94.6	100	Bccry2	84.36	100
Blue light sensing									
Mfcwcl1	MFRU_072g00010	putative white collar-1 protein	1106	MIWC1	96.26	99.91	Bcwcl1	67.38	97
Mfcwcl2	MFRU_002g04340	putative white collar-2 protein	483	MIWC2	95.65	100	Bcwcl2	72.27	99
Mfcvvd1	MFRU_006g01210	vivid PAS VVD protein	237	MIVVD1	94.09	100	Bcvvd1	73.84	100
Green light sensing									
Mfcop1	MFRU_001g04210	putative opsin-1 protein, translocase	310	MIOPS1	96.12	100	Bcpop1	87.5	100
Mfcop2	MFRU_009g00610	putative opsin-like protein, translocase	340	MIOPS2	89.12	100	Bcpop2	81.47	100
Red/far red ratio sensing									
Mfcphy1	MFRU_022g00870	PHY1, histidine kinase-group VIII protein	1612	MIPHY1	94.18	99.75	Bcphy1	77.91	99
Mfcphy2	MFRU_023g00600	PHY2, histidine kinase-group VIII protein	1221	MIPHY2	92.08	99.59	Bcphy2	75.69	100
Mfcphy3	MFRU_005g01680	PHY3, histidine kinase-group VIII protein	1197	MIPHY3	93.98	100	Bcphy3	76.11	97
Implicated in photoresponse									
Mfcvel1	MFRU_013g00210	velvet complex subunit 1	609	MIVEL1	94.39	100	Bevel1	72.76	96

Mfcvel2	MFRU_014g01690	velvet complex subunit 2	445	MIVEL2	95.74	94.61	Bcvel2	86.92	94
Mfcvel3	MFRU_027g01050	velvet 3	497	MIVEL3	95.57	100	Bevel3	79.84	100
Mfcvel4	MFRU_018g00640	velvet 4	395	MIVEL4	95.16	98.4	Bevel4	87.11	95

Table 2. Gene ontology and functional annotation for putative photoreception related genes identified in the *M. fructicola* 38C predicted proteome.

Gene	Protein ID	GO ID	GO Name	Enzyme name
vvd1	MFRU_006g01210	C:GO:0005634	C:nucleus	putative vivid pas protein
cry1	MFRU_030g01000	P:GO:0000719; P:GO:0018298; F:GO:0016829; F:GO:0097159; F:GO:1901363	P:photoreactive repair; P:obsolete protein-chromophore linkage; F:lyase activity; F:organic cyclic compound binding; F:heterocyclic compound binding	Lyases
cry2	MFRU_004g02180	P:GO:0006281; P:GO:0018298; P:GO:0060258; P:GO:0075308; F:GO:0003913	P:DNA repair; P:obsolete protein-chromophore linkage; P:negative regulation of filamentous growth; P:negative regulation of conidium formation; F:DNA photolyase activity	Carbon-carbon lyases
phy1	MFRU_022g00870	P:GO:0000160; P:GO:0006355; P:GO:0009584; P:GO:0016310; P:GO:0018298; P:GO:1902531; F:GO:0000155; F:GO:0005524; F:GO:0009881; C:GO:0005737	P:phosphorelay signal transduction system; P:regulation of DNA-templated transcription; P:detection of visible light; P:phosphorylation; P:obsolete protein-chromophore linkage; P:regulation of intracellular signal transduction; F:phosphorelay sensor kinase activity; F:ATP binding; F:photoreceptor activity; C:cytoplasm	Transferring phosphorus-containing groups; Histidine kinase
phy2	MFRU_023g00600	P:GO:0000160; P:GO:0006355; P:GO:0009584; P:GO:0016310; P:GO:0018298; P:GO:1902531; F:GO:0000155; F:GO:0005524; F:GO:0009881; C:GO:0005737	P:phosphorelay signal transduction system; P:regulation of DNA-templated transcription; P:detection of visible light; P:phosphorylation; P:obsolete protein-chromophore linkage; P:regulation of intracellular signal transduction; F:phosphorelay sensor kinase activity; F:ATP binding; F:photoreceptor activity; C:cytoplasm	Transferring phosphorus-containing groups; Histidine kinase
phy3	MFRU_005g01680	P:GO:0000160; P:GO:0006355; P:GO:0009584; P:GO:0016310; P:GO:0018298; P:GO:1902531; F:GO:0000155; F:GO:0005524; F:GO:0009881; C:GO:0005737	P:phosphorelay signal transduction system; P:regulation of DNA-templated transcription; P:detection of visible light; P:phosphorylation; P:obsolete protein-chromophore linkage; P:regulation of intracellular signal transduction;	Transferring phosphorus-containing groups; Histidine kinase

			F:phosphorelay sensor kinase activity; F:ATP binding; F:photoreceptor activity; C:cytoplasm	
op1	MFRU_001g04210	P:GO:0007602; P:GO:0018298; P:GO:0034220; F:GO:0005216; F:GO:0009881; C:GO:0016021	P:phototransduction; P:obsolete protein-chromophore linkage; P:ion transmembrane transport; F:ion channel activity; F:photoreceptor activity; C:integral component of membrane	Translocases
op2	MFRU_009g00610	P:GO:0007602; P:GO:0018298; P:GO:0034220; F:GO:0005216; F:GO:0009881; C:GO:0016021	P:phototransduction; P:obsolete protein-chromophore linkage; P:ion transmembrane transport; F:ion channel activity; F:photoreceptor activity; C:integral component of membrane	Translocases
wcl1	MFRU_072g00010	P:GO:0006355; F:GO:0008270; F:GO:0043565	P:regulation of DNA-templated transcription; F:zinc ion binding; F:sequence-specific DNA binding	putative white collar 1 protein
wcl2	MFRU_002g04340	P:GO:0006355; F:GO:0008270; F:GO:0043565; C:GO:0005634	P:regulation of DNA-templated transcription; F:zinc ion binding; F:sequence-specific DNA binding; C:nucleus	putative white collar-2 protein
vel1	MFRU_013g00210	P:GO:0030435; C:GO:0005634; C:GO:0005737; C:GO:0016021	P:sporulation resulting in formation of a cellular spore; C:nucleus; C:cytoplasm; C:integral component of membrane	Velvet 1
vel2	MFRU_014g01690	P:GO:0030435; C:GO:0005634; C:GO:0005737	P:sporulation resulting in formation of a cellular spore; C:nucleus; C:cytoplasm	putative developmental regulator protein
vel3	MFRU_027g01050	C:GO:0005634	C:nucleus	putative velvet 3 protein
vel4	MFRU_018g00640	C:GO:0005634	C:nucleus	putative vea protein

The predicted domain architecture of photoreceptors agreed with previous studies. Three red/far red ratio light sensing photoreceptors known as phytochromes (*MfcpHY1*, *MfcpHY2* and *MfcpHY3*) were found. These proteins contain a light sensing PAS-GAF-PHY module, in addition to domains commonly found in hybrid histidine kinases (HKs). Rhodopsins are green light driven proton pumps integrated in the cell membrane and carrying a covalently bound all-trans-retinal as the chromophore, finding two of this type of photoreceptors in *M. fructicola* strain 38C, *Mfcop1* and *Mfcop2*. For blue light sensing there are many unrelated proteins, commonly referred as LOVs, with a LOV (Light, Voltage, Oxygen) domain bounded to a flavin adenine dinucleotide (FAD/FMN). *M. fructicola* strain 38C had three putative photoreceptors from two distinct LOVs groups, namely L1, which are GATA-type zinc transcription factors; and L2, a group of proteins with a conserved LOV domain, but lacking any effector domain. These putative photoreceptors were *Mfcwcl1*, *Mfcwcl2* and *Mfcvvd1*, respectively. The last photoreceptor group found in the predicted proteome of strain 38C were 2 cryptochromes, *Mfccry1* and *Mfccry2*. These proteins were very similar to photolyases that have gained a signaling function. They sense near-UV/blue light with methenyltetrahydrofolate (MTHF) as antenna pigment and FAD as the photocatalytic chromophore, both covalently bound to PHR and FAD-binding

domains. Another important component of the light sensing and signaling machinery is the *velvet* protein family, which links development and secondary metabolism with light. *Mfcvel1*, *Mfcvel2*, *Mfcvel3* and *Mfcvel4* were found in 38C (Figure 3). Gene Ontology and Functional Annotation analysis confirmed the putative photoreponse function of the genes identified in the 38C predicted proteome (Table 2).

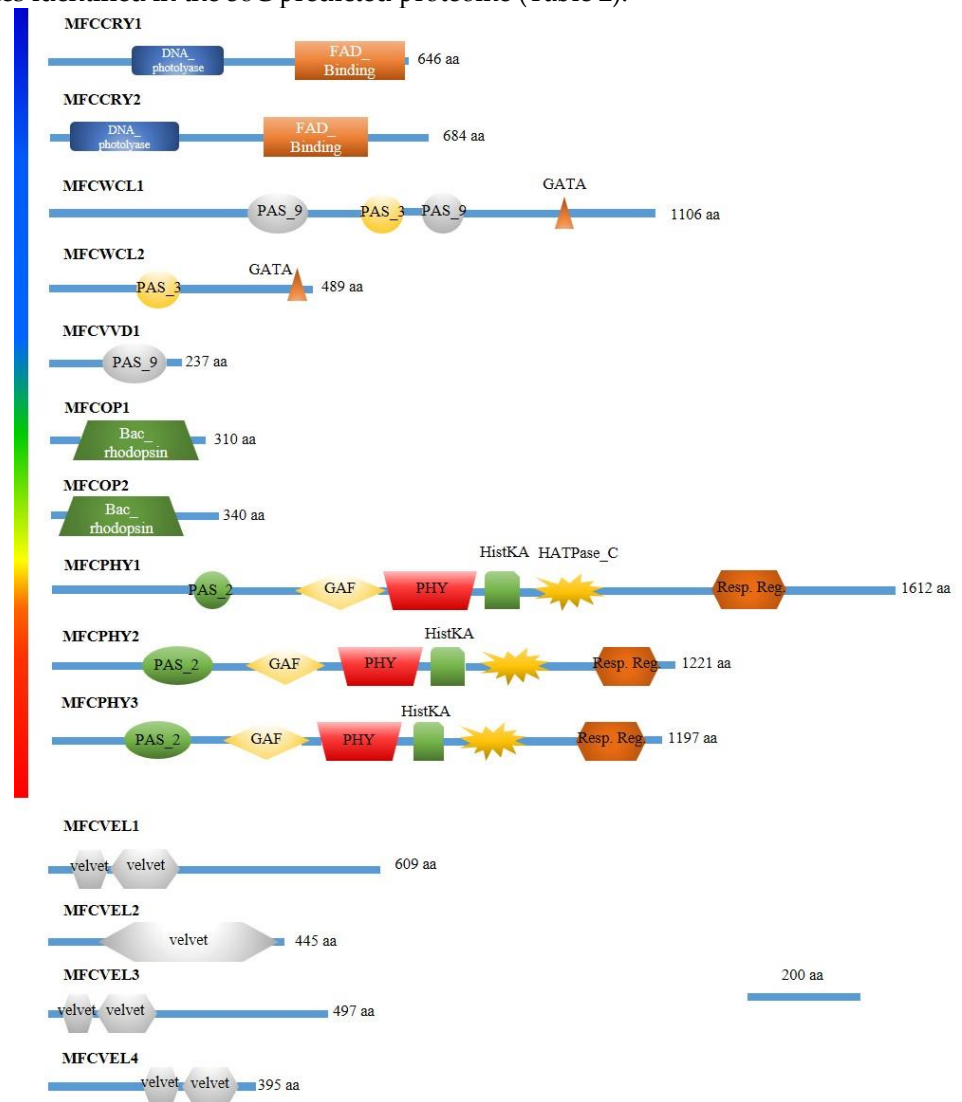


Figure 3. Domain architecture of putative Photoreceptors and velvet family genes in *Monilinia fructicola* strain 38C. DNA_photolyase (PF00875), FAD_binding (PF03441), PAS_9 (PF13426), PAS_3 (PF08447), GATA (PF00320), Bac_rhodopsin (PF01036), PAS_2, (PF08446), GAF (PF01590), PHY (PF00360), HisKA (PF00512), HATPase_C (PF02518), Re-sponse_reg (PF00072), Velvet (PF11754)

3.3 Transcriptional profiles in the light and darkness in *M. fructicola*.

Disease symptoms were not visible on fruit inoculated with 38C conidial suspension after the incubation and irradiation period, neither on the control group in continuous darkness. Comparative analysis was done among RNAseq samples of infected fruit tissue by 38C after 5 minutes and 14 h of daylight irradiation and continuous darkness. The majority of transcripts that *M. fructicola* 38C expressed during the infection process, 6,309 at 5 min of illumination and 4,800 after 14 h, did not show any significant differences in expression levels regarding light conditions. There was another group of transcripts, 3,612 at 5 min of illumination and 4,927 after 14 h, which were not expressed by the fungus, or had expression values under the cut off. However, there was a set of transcripts that

changed their expression profile affected by light conditions, 165 at 5 min of illumination and 359 after 14 h (Table 3).

Table 3. Summary of RNAseq results

RNAseq Analysis	N° upregulated transcripts	N° downregulated transcripts	N° transcripts with no changes	N° no expression transcripts
5 minutes daylight against continuous darkness	126	39	6,309	3,612
14h daylight against continuous darkness	188	171	4,800	4,927

Among the 165 genes from 38C that showed modified expression after 5 min of 58w “daylight” exposure, 126 of which were upregulated, while the remaining 39 were downregulated. At 14 h of illumination, the number of upregulated transcripts was 188, a 49.2% increase, and the amount of also grew to 171 for the downregulated gene class, which meant a 47.0% increase. Samples at 5 min and 14 h of illumination shared 34 upregulated and 9 downregulated transcripts (Supplementary table 2). Raw reads corresponding to this RNAseq are available in PRJNA1011491.

Using CLC Genome Workbench (Qiagen) we performed GO enrichment analysis among the DEGs in our RNAseq results for biological process, cell wall component and molecular function categories. In total, we found 165 different GO terms for the 5 minutes comparison and 125 for the 14 hours comparison (figure 4). Most overrepresented GO terms at 5 minutes and 14 hours post irradiation were peptide metabolic process (14 hpi) and metabolic process (5 minutes pi) for the biological process category, cytoplasmic part (14 hpi) and membrane part (5 minutes pi) for the cellular component category, and oxidoreductase activity (14 hpi) and catalytic activity (5 minutes pi) for the molecular function category. A summary of GO terms search in DEGs is shown in supplementary material (Gene set test.xlsx).

We detected a shift in *M. fructicola* strain 38C transcriptional activity due to light exposure, in the number of DEGs and which genes were transcribed. GO terms dealing with carbohydrate metabolic process, polysaccharide catabolic process, extracellular region and hydrolase activity on different substrates were also enriched among DEGs. This suggests that light might have a regulatory function in the production of carbohydrate active enzymes (CAZymes), some of which are related to the host cell wall degrading process acting, thus, as pathogenicity factors for *M. fructicola*.

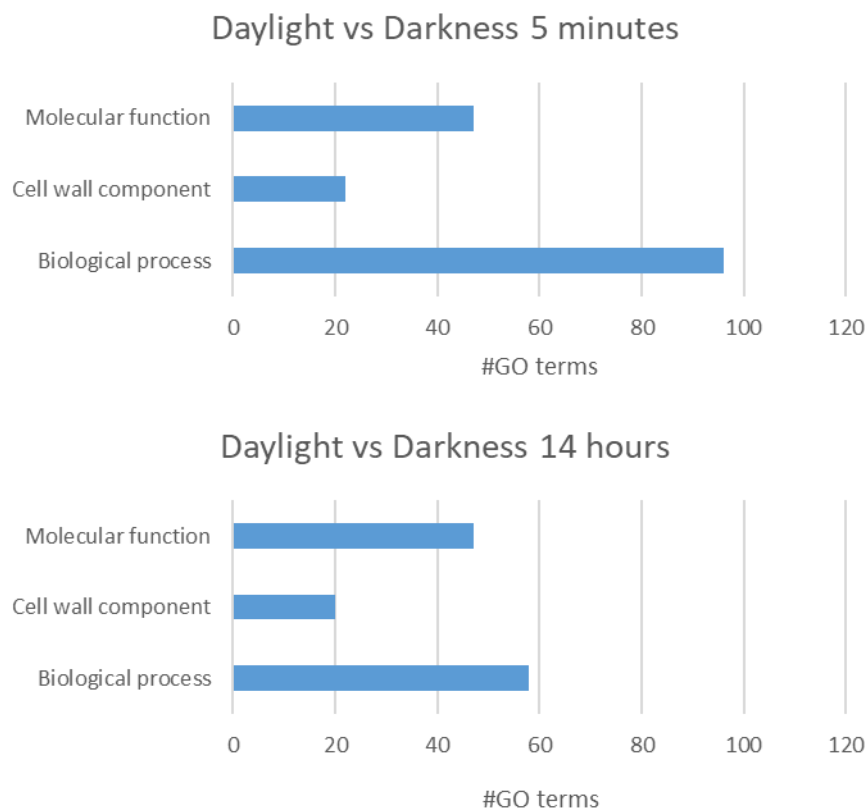


Figure 4. Distribution of GO terms by category on the DEGs at 5 minutes and 14 hours post irradiation

3.4 Photoregulation of photoreceptor genes in *M. fructicola*.

Among DEGs in RNAseq only one of the putative photoreceptor coding genes was present in 38C, *vvd1*. The remaining predicted photoreceptor genes were unaffected by light (Table 4), or showed very low expression values (measured as transcript per millions, TPMs). Searching for upregulated transcript that could be related to photoreceptor in 38C we found the gene MFRU_021g00620.1, named from now on *far1*, who was significantly upregulated in light over darkness in both time stamps (Table 4). Gene Ontology and functional annotation did not assign any function nor GO terms for this gene.

Table 4. Expression values measured in TPMs for putative photoreception related genes in *M. fructicola* 38C.

Gene	5 minutes			14 hours		
	TPM daylight	TPM darkness	Log ₂ FoldChange	TPM daylight	TPM darkness	Log ₂ FoldChange
MFCFAR1	657,9	34,1	4,3	534,4	38,2	3,6
MFCCRY1	90,5	40,2	1,2	48,4	22,8	0,9
MFCCRY2	197,5	109,6	0,9	32	26	-0,5
MFCWCL1	31,8	47,2	-0,5	24,4	21,7	0
MFCWCL2	64,4	41	0,7	35,6	11,9	1,4
MFCVVD1	346,4	27,2	3,7	105,93	35,1	1,4
MFCOP1	593,3	254,9	1,2	181,1	210,2	-0,4
MFCOP2	13,2	1,4	3,3	3,5	4,5	0,2
MFCPHY1	25,2	33,4	-0,4	11,1	15,6	1,2
MFCPHY2	66,6	28,1	1,3	33,2	11,6	1,3
MFCPHY3	0,7	0,2	1,5	0	0,5	-3,3
MFCVEL1	99,9	141,7	-0,5	46,5	57,2	-0,5
MFCVEL2	118,7	93,5	0,4	78,6	28,8	1,3
MFCVEL3	4	5,1	-0,4	1,2	0	3
MFCVEL4	20,3	23,6	-0,2	11,6	17	-0,7

3.5 *far1*, a small protein coding gene upregulated during light exposure.

Far1 is a short protein (82aa) with undefined function, lacking any known conserved domains or associated GO Terms. Putative homologous genes to *far1* were found in related fungal genomes. The blastp tool in UniProt [24] returned 250 hits, of which 248 belonged to the Ascomycota phylum, all of them belonging to the Pezizomycotina subdivision, with hits in six of twelve classes within this clade. The most abundant classes were Eurotiomycetes, with 91 hits including genus *Aspergillus* and *Penicillium* spp; Sordariomycetes with 70 hits including genus like *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Verticillium*, *Neurospora*, *Magnaporthe* and *Rosellinia* spp; and Leotiomycetes with 58 hits including genus like *Botrytis*, *Monilinia* and *Sclerotinia* spp. Thus, *Far1* is a widely distributed protein in the phylum Ascomycota, present in some important species of phytopathogenic fungi and well-studied model organisms (Figure S1).

When reconstructing the evolutionary relations using the amino acidic sequence of the protein, we found that all *Monilinia* spp. sequences formed a clade together, with *Sclerotinia* spp. and *Botrytis* spp. as close relatives. The rest of clades in the tree are much more uncertain, suggesting conserved functions in those orthologs belonging to the Leotiomycetes class (Figure 5).

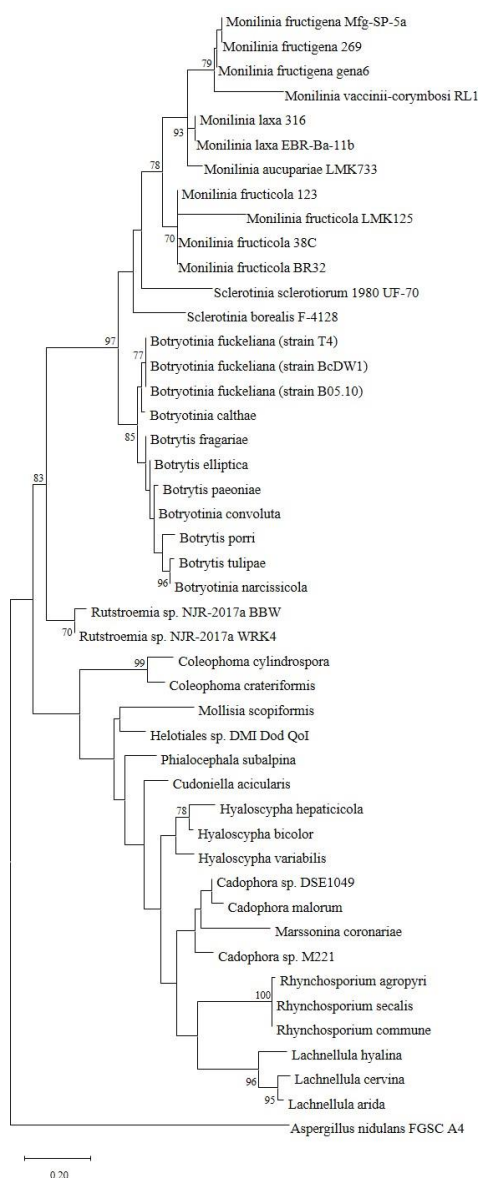


Figure 5. Evolutionary analysis of *far1* orthologs by Maximum Likelihood method. The evolutionary history was inferred by using the Maximum Likelihood method and JTT matrix-based model [25]. The tree with the highest log likelihood (-2766.09) is shown. The percentage of trees in which the associated taxa clustered together is shown next to the branches. Initial tree(s) for the heuristic search were obtained automatically by applying Neighbor-Join and BioNJ algorithms to a matrix of pairwise distances estimated using the JTT model, and then selecting the topology with superior log likelihood value. The tree is drawn to scale, with branch lengths measured in the number of substitutions per site. This analysis involved 46 amino acid sequences. There was a total of 221 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA X [22].

3.6 Differential expression analysis using RT-qPCR in *M. fructicola*.

Far1 and only VIVID1 (*vvd1*) among the putative photoreceptors and putative light sensing protein coding genes were differentially expressed under light in our transcriptomic analysis. We confirmed these transcriptional profiles using RT-qPCR. We used the same infected plant tissue samples by 38C that were subject of RNAseq analysis. Genes *vvd1* and *far1* showed statistically significant upregulation when exposed to 58w daylight by RT-qPCR. *vvd1* greatly increased its expression levels after a short light pulse of 5 min,

decreasing with time but still being significantly different than continuous darkness, and rising up again at the 14 h post irradiation time stamp. Expression levels of *far1* were up-regulated upon light exposure, reaching its peak at 14 h post irradiance when 38C grew over plant tissue (Figure 6).

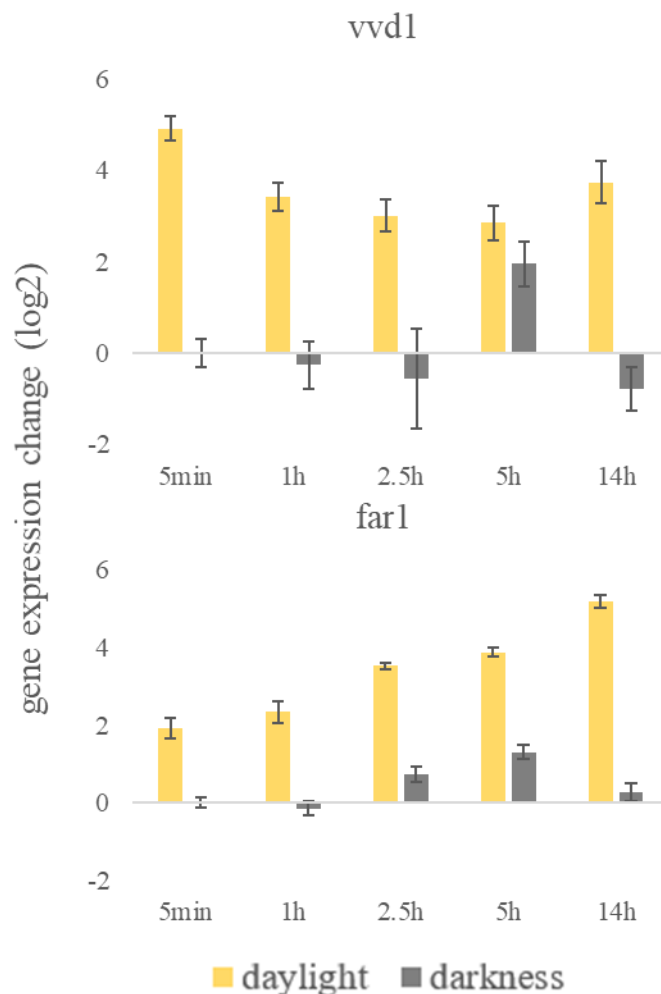


Figure 6. Changes in relative gene expression of two putative light-sensing protein coding genes (*vvd1* and *far1*) after daylight exposure and continuous darkness on different time points of *M. fructicola* strain 38C when growing on fruit tissue. The scale is $\text{Log}_2 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ of mean fold change values, including standard deviation, from three biological replicates, with three technical replicates each one, after normalization against 0h post illumination using the $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ method [23], with histone H3 as endogenous control gene.

We also questioned whether the presence of fruit would modify the effect of light exposure on the expression levels of photoreceptors. Only 5 out of 8 putative photoreceptor genes and the unknown function gene *far1* significantly increased their expression levels over the time *M. fructicola* 38C was exposed to light when growing in PDB (Figure 7). Blue-light-sensing *vvd1* was the most upregulated gene, increasing its expression levels sixfold at 1h post-irradiation and maintaining these expression levels throughout the whole experiment. Genes encoding near-UV/blue light sensing proteins *cry1* and *cry2* both showed the same pattern, continuously increasing their expression levels, but never reaching those of *vvd1*. *phy2*, encoding a red light photoreceptor, shares the same expression profile as *cry1* and *cry2* but with a lesser fold change overall. In contrast, green light photoreceptor *op2* activates its expression at five minutes of light exposure and reach its highest at 1 h post illumination, at 3.5fold, and then decreases its expression levels to not be significantly different from continuous darkness. Not all these genes were modified in a continuous darkness condition (Figure 7). The remaining photoreceptor coding genes that were tested did not show any significant changes in gene expression under these conditions (data not shown).

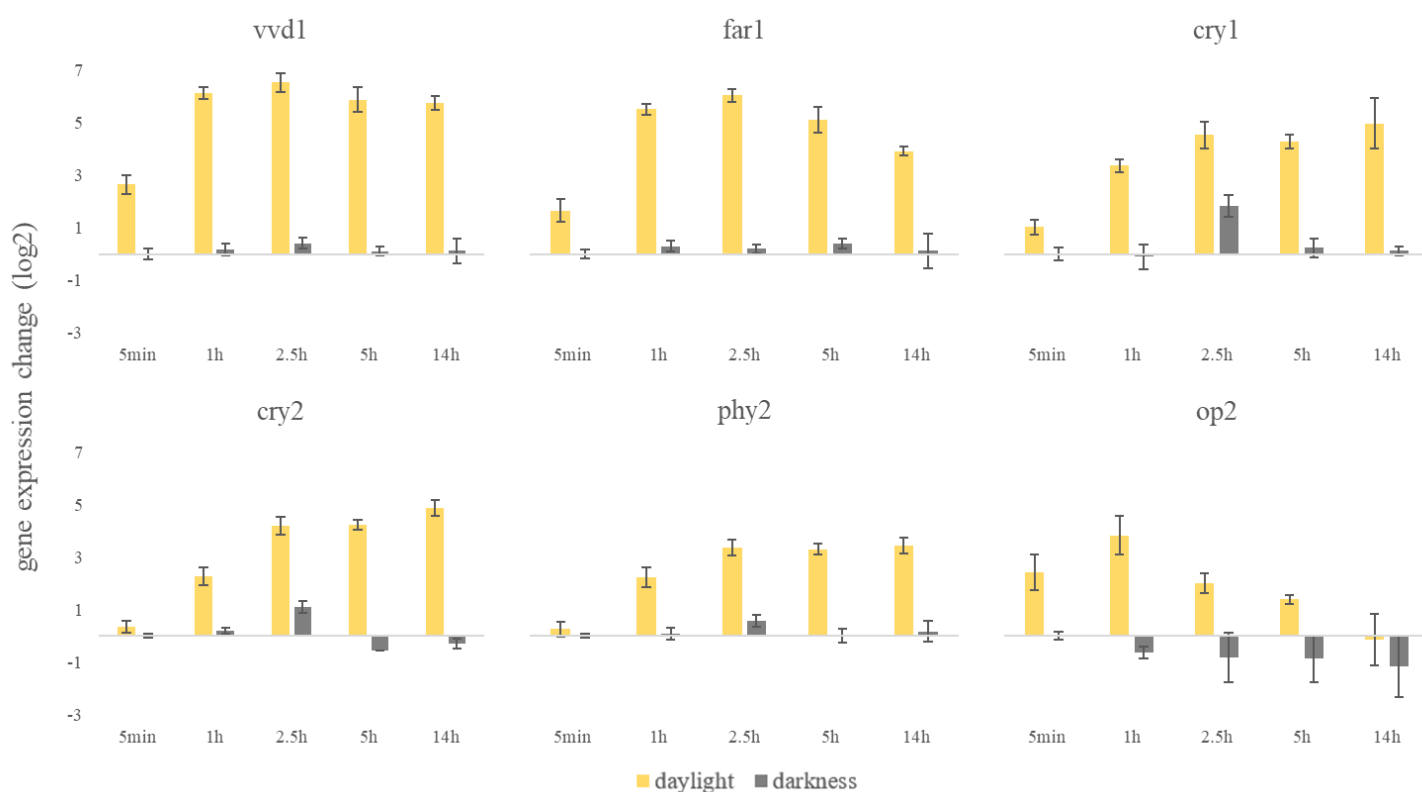


Figure 7. Changes in relative gene expression of six putative light-sensing protein coding genes after daylight exposure and continuous darkness on different time stamps when *M. fructicola* strain 38C grew in PDB. The scale is $\text{Log}_2 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ of mean fold change values from two separate experiments, including standard deviation, from three biological replicates, with three technical replicates each one, after normalization against 0h post illumination using the $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ method [23], with histone H3 as endogenous control gene.

4. Discussion

White light emitted by fluorescent bulbs used in this work has a significant effect on growth and sporulation of *M. fructicola* and on some of its photoresponse genes in pre-penetration stages. Light is an essential source of abiotic environmental information for many fungi, regulating key elements of their behavior. *Aspergillus nidulans* is regulated in a light dependent manner [26] with red light playing a dominant role, while *B. cinerea* needs light-dark cycles for production of conidia [27]. Growth and conidiation of *M. laxa*

on PDA were significantly affected by light and photoperiod [12]. However, *M. fructicola* responds to light stimulus differently than *M. laxa*, especially because sporulation of *M. laxa* was always favored with light and photoperiod [12;28], an effect not observed in *M. fructicola*.

Light effect on fungal growth and sporulation might be specific to fungal genus, species of the same genus, strains, or different light sources [26;29]. The same isolate of *M. fructicola* 38C showed no difference in growth and sporulation under LEDs and darkness [30], which could be explained by the different qualities of light emitted by LEDs vs fluorescent tubes. Also, there are differences in light wave composition between different models and brands of fluorescent light bulbs. For example, our light sources had less quantity of light emitted in the 400-450 nm range than the 500-550 nm range, which could affect the expression of genes controlled by photoreceptors excited light of either of those wavelengths. This could explain why we were unable to find photoactivation of the *white collar complex* (WCC), as this photoreceptor senses light with a wavelength of 450 nm.

Furthermore, growth and sporulation differences between the two *M. fructicola* strains were observed in the present study. While strain 1C, less virulent than 38C, did not show any statistically significant difference in conidia production between light and continuous darkness, strain 38C was unable to produce conidia under the two photoperiods tested, but only produced conidia under continuous darkness. There are reported cases in the literature of “blind” strains resulting in anomalous regulation of conidia production in which the mutation resulting in such phenotype has been identified in a photoreceptor or a light response related protein. *Botrytis cinerea* T4 is a wild isolate with a mutation in the Velvet protein BcVEL1. It produces a truncated protein resulting in a loss of function. This strain is considered as “blind” and shows an “always conidia” phenotype, producing conidia regardless of illumination conditions. This phenotype is also associated with a reduction in virulence on several plant hosts [31]. This shows that *vel1* might be implicated in the regulation mechanisms for conidia production. The “always conidia” phenotype is also found in *A. nidulans* carrying the *veA1* mutation [26]. *veA* is a homologous gene to *vel1* from *B. cinerea*. *A. nidulans* VeA1 mutant protein lacks the first 36 amino acids at the N-terminus and is not able to migrate from cytoplasm to nucleus, failing to respond to light, explaining the light independent conidiation phenotype displayed by those strains carrying the *veA1* allele [32]. In *B. cinerea* there was identified a mutation in the *BcveA* gene and loss-of-function mutants of photoreceptor coding gene *bcphy3*, all causing evident morphological defects and reduced virulence in a light independent way [33]. However, even though *M. fructicola* is more virulent than *M. laxa*, no differences were found between its photoreceptors that could explain the light effect on 38C conidia production.

Differential transcriptional regulation mediated by light of photoreceptors and light response related proteins could also explain the anomalous conidiation phenotype of strain 38C. Some transcripts expressed by *M. fructicola* 38C during the fruit infection process and measured by RNAseq showed significant differences between light and dark infection conditions in the present study. Among photoreceptors, only *vvd1* showed significant differences in its transcripts between light and dark infection conditions in infecting plant tissue. However, these results could be affected by growth culture media and, as we discussed before, light wave composition of light sources. Light had a significant effect on *M. fructicola* strain 38C transcriptional profile, affecting genetic expression of key Photoreceptors, namely *vvd1*, *cry1*, *cry2*, *op2* and *phy2* when *M. fructicola* was cultured in liquid medium. All the above photoreceptors were also found to be light inducible in *M. laxa* strain 8L [12]. They also found that light produces differential expression on *vel1* and *vel4*, which are involved in conidiation regulation, but we found no light effect on 38C for those genes. However, *M. fructicola* 38C showed serious difficulties to sporulate on PDA after incubation for 6 days under white light.

While we did not find any evidence of photo-regulation for *wcl1* and *wcl2* among the DEGs in our RNAseq on infected nectarine tissue, our study shows that *vvd1*, a blue light

photoreceptor with an antagonistic regulatory function of the WCC by physical interaction [34], had an early, high and consistent photoinduction in every condition we tested. Another photoreceptor that could be involved in explaining our results was *cry2*, which had a role in negative regulation of conidia formation [13], and was found to be photoinducible for *M. fructicola* strain 38C in PDB. Additional studies are required to determine whether *vod1* or *cry2* have a role in regulating conidiation in *M. fructicola* and if it could explain 38C's anomalous conidiation behavior. *Wcl1* and *wcl2* join together to form the White Collar Complex (WCC), which is a primary regulator of light-responsive genes [7;35;36]. These photoreceptors did not show any light regulation in *M. laxa* [12], and some unpublished results suggesting the same for *M. fructigena*.

On the other hand, gene MFRU_021g00620.1 from now on named *far1*, was significantly upregulated in light against darkness on our RNAseq on infected plant tissue. And RT-qPCR confirmed these results using total RNA from mycelial samples grown in liquid culture. *far1*, which encodes for a small protein, and which may serve as a light response signal, is present in some *Monilinia* species and other related fungi. Far1 protein does not have any known function and our GO annotation did not assign any GO terms, however, a putative homologue of Far1 in *B. cinerea* is already labeled as “conidiation protein” in Uniprot data base. Far1 is highly induced by light, and might also play a role in explaining the abnormal conidiation behavior of 38C.

Further investigation is required to unravel the function of *far1* and its role in photoreception. Genetic transformation is a powerful tool for functional characterization of genes, however, *M. fructicola* strain 38C is recalcitrant to transformation, and due to the lack of successful and consistent transformation protocols, we have not been able to perform gene knockout or overexpression experiments to confirm a possible direct function of Far1 in photoreception. Our laboratory has made some efforts in order to overcome this situation but success in obtaining mutant strains is daunting [37]. Both *vod1* and *far1* showed early, high and consistent light upregulation in all the conditions tested in this study and are present in all *Monilinia* species. Thus, we think they are perfect candidates for light response signaling genes.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: www.mdpi.com/xxx/s1, Figure S1: title; Table S1: title; Video S1: title.

Author Contributions: Conceptualization, J.A., A.C. and E.A.E.; methodology, J.A.; formal analysis, J.A. and A.C.; investigation, J.A.; resources, J.A. and A.C.; data curation, J.A.; writing—original draft preparation, J.A.; writing—review and editing, A.C. and E.A.E.; visualization, J.A.; supervision, A.C., P.M. and E.A.E.; project administration, A.C. and P.M.; funding acquisition, A.C. and P.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was funded by grants PID2020-115702RB-C21/ AEI / 10.13039/501100011033); PID2021-124278OB-I00/ MCIN/AEI/ 10.13039/501100011033/FEDER,UE, and AGL2017-84389-C2-2-R from (MINECO/AEI/FEDER, UE). J.D. Astacio received a Ph.D. fellowship (PRE2018-085721) from the Ministry of Science, Innovation and Universities (Spain).

Data Availability Statement:

Data available in a publicly accessible repository that does not issue DOIs

Publicly available datasets were analyzed in this study. This data can be found here: PRJNA1011491

Conflicts of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

References

1. Byrde, R.J.W.; Willetts, H.J. Chapter 2 - TAXONOMY AND NOMENCLATURE. In: Byrde RJW, Willetts HJ (Eds.). *The Brown Rot Fungi of Fruit*. Pergamon, 1977: pp. 15-31.
2. Villarino, M.; Egüen, B.; Lamarca, N.; Segarra, J.; Usall, J.; Melgarejo, P.; De Cal, A. Occurrence of *Monilinia laxa* and *M. fructigena* after introduction of *M. fructicola* in peach orchards in Spain. *European Journal of Plant Pathology* **2013**, *137*, 835-845. <https://doi.org/10.1007/s10658-013-0292-6>.
3. Lee, M.H.; Bostock, R.M. Induction, Regulation, and Role in Pathogenesis of Appressoria in *Monilinia fructicola*. *Phytopathology* **2006**, *96*, 1072-1080. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-96-1072>.
4. Garcia-Benitez, C.; Melgarejo, P.; De, C.A. Fruit maturity and post-harvest environmental conditions influence the pre-penetration stages of *Monilinia* infections in peaches. *Int J Food Microbiol* **2017**, *241*, 117-122. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.09.010>.
5. Roden, L.C.; Ingle, R.A. Lights, rhythms, infection: the role of light and the circadian clock in determining the outcome of plant-pathogen interactions. *Plant Cell* **2009**, *21*, 2546-2552. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.069922>.
6. Idnurm, A.; Crosson, S. The photobiology of microbial pathogenesis. *PLoS Pathog* **2009**, *5*, e1000470. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000470>.
7. Linden, H.; Macino, G. White collar 2, a partner in blue-light signal transduction, controlling expression of light-regulated genes in *Neurospora crassa*. *EMBO J* **1997**, *16*, 98-109. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.1.98>.
8. Bayram, O.; Feussner, K.; Dumkow, M.; Herrfurth, C.; Feussner, I.; Braus, G.H. Changes of global gene expression and secondary metabolite accumulation during light-dependent *Aspergillus nidulans* development. *Fungal Genet Biol* **2016**, *87*, 30-53. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2016.01.004>.
9. Bayram, O.; Braus, G.H.; Fischer, R.; Rodriguez-Romero, J. Spotlight on *Aspergillus nidulans* photosensory systems. *Fungal Genet Biol* **2010**, *47*, 900-908. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2010.05.008>.
10. Herrera-Estrella, A.; Horwitz, B.A. Looking through the eyes of fungi: molecular genetics of photoreception. *Mol Microbiol* **2007**, *64*, 5-15. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05632.x>.
11. Schumacher, J. How light affects the life of *Botrytis*. *Fungal Genet Biol* **2017**, *106*, 26-41. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2017.06.002>.
12. Rodriguez-Pires, S.; Espeso, E.A.; Rasiukeviciute, N.; Melgarejo, P.; De, C.A. Light-Photoreceptors and Proteins Related to *Monilinia laxa* Photoresponses. *J Fungi (Basel)* **2021**, *7*. <https://doi.org/10.3390/jof7010032>.
13. Cohrs, K.C.; Schumacher, J. The Two Cryptochrome/Photolyase Family Proteins Fulfill Distinct Roles in DNA Photorepair and Regulation of Conidiation in the Gray Mold Fungus *Botrytis cinerea*. *Appl Environ Microbiol* **2017**, *83*. <https://doi.org/10.1128/AEM.00812-17>.
14. Rodriguez-Pires, S.; Melgarejo, P.; De, C.A.; Espeso, E.A. Proteomic Studies to Understand the Mechanisms of Peach Tissue Degradation by *Monilinia laxa*. *Front Plant Sci* **2020**, *11*, 1286. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01286>.
15. Rodriguez-Pires, S.; Melgarejo, P.; De, C.A.; Espeso, E.A. Pectin as Carbon Source for *Monilinia laxa* Exoproteome and Expression Profiles of Related Genes. *Mol Plant Microbe Interact* **2020**, *33*, 1116-1128. <https://doi.org/10.1094/MPMI-01-20-0019-R>.
16. Vilanova, L.; Valero-Jimenez, C.A.; van Kan, J.A.L. Deciphering the *Monilinia fructicola* Genome to Discover Effector Genes Possibly Involved in Virulence. *Genes (Basel)* **2021**, *12*. <https://doi.org/10.3390/genes12040568>.
17. Sauer, D.B.; Burroughs, R. Disinfection of seed surfaces with sodium hypochlorite. *Phytopathology* **1986**, *76*, 745-749.

18. Gambino, G.; Perrone, I.; Gribaudo, I. A Rapid and effective method for RNA extraction from different tissues of grapevine and other woody plants. *Phytochem Anal* **2008**, *19*, 520-525. <https://doi.org/10.1002/pca.1078>.
19. Espeso, E.A.; Villarino, M.; Carreras, M.; Alonso-Guirado, L.; Alonso, J.M.; Melgarejo, P.; Larena, I. Altered nitrogen metabolism in biocontrol strains of *Penicillium rubens*. *Fungal Genet Biol* **2019**, *132*, 103263. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2019.103263>.
20. QIAGEN CLC Genomics Workbench 22.0.3; (<https://digitalinsights.qiagen.com>). 2023.
21. Götz, S.; Garcia-Gomez, J.M.; Terol, J.; Williams, T.D.; Nagaraj, S.H.; Nueda, M.J.; Robles, M.; Talon, M.; Dopazo, J.; Conesa, A. High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. *Nucleic Acids Res* **2008**, *36*, 3420-3435. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn176>.
22. Kumar, S.; Stecher, G.; Li, M.; Knyaz, C.; Tamura, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol Biol Evol* **2018**, *35*, 1547-1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>.
23. Schmittgen, T.D.; Livak, K.J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* **2008**, *3*, 1101-1108. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>.
24. UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2023. *Nucleic Acids Res* **2023**, *51*, D523-D531. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1052> [doi].
25. Jones, D.T.; Taylor, W.R.; Thornton, J.M. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Comput Appl Biosci* **1992**, *8*, 275-282. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/8.3.275>.
26. Mooney, J.L.; Yager, L.N. Light is required for conidiation in *Aspergillus nidulans*. *Genes Dev* **1990**, *4*, 1473-1482. <https://doi.org/10.1101/gad.4.9.1473>.
27. Schumacher, J.; Pradier, J.M.; Simon, A.; Traeger, S.; Moraga, J.; Collado, I.G.; Viaud, M.; Tudzynski, B. Natural variation in the VELVET gene *bcvel1* affects virulence and light-dependent differentiation in *Botrytis cinerea*. *PLoS One* **2012**, *7*, e47840. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047840>.
28. Rodríguez-Pires, S.; Garcia-Company, E.A.; Melgarejo, P.; De Cal, A. Influence of light on the *Monilinia laxa*-stone fruit interaction. *Plant Pathol* **2021**, *70*, 326-335. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/ppa.13294>.
29. Schumacher, J.; Simon, A.; Cohrs, K.C.; Viaud, M.; Tudzynski, P. The transcription factor BcLTF1 regulates virulence and light responses in the necrotrophic plant pathogen *Botrytis cinerea*. *PLoS Genet* **2014**, *10*, e1004040. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004040>.
30. Verde-Yanez, L.; Vall-Llaura, N.; Usall, J.; Teixido, N.; Torres, R. Phenotypic plasticity of *Monilinia spp.* in response to light wavelengths: From in vitro development to virulence on nectarines. *Int J Food Microbiol* **2022**, *373*, 109700. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109700>.
31. Schumacher, J.; Simon, A.; Cohrs, K.C.; Traeger, S.; Porquier, A.; Dalmais, B.; Viaud, M.; Tudzynski, B. The VELVET Complex in the Gray Mold Fungus *Botrytis cinerea*: Impact of BcLAE1 on Differentiation, Secondary Metabolism, and Virulence. *Mol Plant Microbe Interact* **2015**, *28*, 659-674. <https://doi.org/10.1094/MPMI-12-14-0411-R>.
32. Stinnett, S.M.; Espeso, E.A.; Cobeno, L.; Araujo-Bazan, L.; Calvo, A.M. *Aspergillus nidulans* VeA subcellular localization is dependent on the importin alpha carrier and on light. *Mol Microbiol* **2007**, *63*, 242-255. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05506.x>.
33. Hu, Y.; He, J.; Wang, Y.; Zhu, P.; Zhang, C.; Lu, R.; Xu, L. Disruption of a phytochrome-like histidine kinase gene by homologous recombination leads to a significant reduction in vegetative growth, sclerotia production, and the pathogenicity of *Botrytis cinerea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **2014**, *85*, 25-33. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2013.12.002>.

34. Chen, C.H.; DeMay, B.S.; Gladfelder, A.S.; Dunlap, J.C.; Loros, J.J. Physical interaction between VIVID and white collar complex regulates photoadaptation in *Neurospora*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2010**, *107*, 16715-16720. <https://doi.org/10.1073/pnas.1011190107>.
35. Ballario, P.; Vittorioso, P.; Magrelli, A.; Talora, C.; Cabibbo, A.; Macino, G. White collar-1, a central regulator of blue light responses in *Neurospora*, is a zinc finger protein. *EMBO J* **1996**, *15*, 1650-1657.
36. Smith, K.M.; Sancar, G.; Dekhang, R. et al. Transcription factors in light and circadian clock signaling networks revealed by genomewide mapping of direct targets for *Neurospora* white collar complex. *Eukaryot Cell* **2010**, *9*, 1549-1556. <https://doi.org/10.1128/EC.00154-10>.
37. Rodriguez-Pires, S.; Espeso, E.A.; Baro-Montel, N.; Torres, R.; Melgarejo, P.; De, C.A. Labeling of *Monilinia fructicola* with GFP and Its Validation for Studies on Host-Pathogen Interactions in Stone and Pome Fruit. *Genes (Basel)* **2019**, *10*. <https://doi.org/10.3390/genes10121033>.

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

A.2.

***Monilinia fructicola* genes involved in the cell wall-degrading process in early nectarine infection**

Juan Diego Astacio^{1,2}, Paloma Melgarejo¹, Antonieta De Cal^{1*} and Eduardo Antonio Espeso³

¹ Grupo de Hongos Fitopatógenos, Departamento de Protección Vegetal, Centro Nacional INIA-CSIC, 28040 Madrid, Spain;

² Programa Biotecnología y Recursos Genéticos de Plantas y Microorganismos Asociados, ETSIA, Universidad Politécnica de Madrid, 28040 Madrid, Spain

³ Laboratorio de Biología Celular de Aspergillus, Departamento de Biología Celular y Molecular, Centro Investigaciones Biológicas Margarita Salas, CSIC (CIB-CSIC), 28040 Madrid, Spain

* Correspondence: cal@inia.csic.es

ABSTRACT

Brown rot symptoms may be linked to alterations in the gene expression pattern of genes associated with cell wall degradation. In this study, we identify key carbohydrate-active enzymes (CAZymes) involved in cell wall degradation by *Monilinia fructicola*, including *pme2* and *pme3* (pectin methylesterases), *cut1* (cutinase) and *nep2* (necrosis-inducing factor). The expression of these genes is significantly modulated by red and blue light during early nectarine infection. The polygalacturonase gene *pg1* and the cellulase gene *cell* also exhibit photoinduction albeit to a lesser extent. Red and blue light cause an acceleration in the initial stages of brown rot development caused by *M. fructicola* on nectarines. Disease symptoms like tissue maceration were evident after an incubation period of 24 h followed by 14 h of light exposition, in contrast to the usual incubation period of 48 to 72 hours. Furthermore, the culture media exerts an impact on gene regulation, suggesting a complex interplay between light and nutrient signalling pathways in *M. fructicola*. In addition, we observe that red light promotes colony growth on a 12 h photoperiod and consistently reduces conidiation. In contrast, blue light hampers growth rate on both the 12 h and the 8 h photoperiod but only diminishes conidiation on the 12 h photoperiod. These findings enhance our comprehension of genes associated with cell wall degradation and the environmental factors influencing brown rot development.

Keywords: brown rot, CAZymes, NEP-like, light wavelength, gene regulation, sporulation

1. INTRODUCTION

Monilinia spp. is among the most economically damaging phytopathological problems on stone fruit in the world, causing brown rot and blossom blight at pre- and post-harvest. *Monilinia laxa* is found worldwide, being considered the main causal agent of the disease in Europe (Rungjindamai et al., 2014). However, *Monilinia fructicola*, which is more aggressive than *M. laxa* (Villarino et al., 2016), has been gaining importance in European and particularly in Spanish orchards in the recent years (Villarino et al., 2013).

M. fructicola is a necrotrophic fungus. The main mode of nectarine colonization by *M. fructicola* is through stomata and penetrate the plant cell wall by altering its composition (Nakajima and Akutsu, 2014). Fungal growth at stomata progressively increases over time and is associated with gradual collapse of the epidermal cells and the subepidermis (Garcia-Benitez et al., 2016). Nectarine infection and colonization by *M. fructicola* in the darkness is associated with degradation of cuticle and epidermis at 24 hours after infection, gradual collapse of epidermal cells after 48 hours and subsequent expansion through the sub-epidermis after 72 hours of infection (Garcia-Benitez et al., 2016).

M. fructicola produces degrading enzymes and phytotoxins for penetrating the fruit surface and invading and colonising the fruit (Byrde and Willetts, 1977). Secretion of Cell Wall-Degrading Enzymes (CWDEs), particularly Carbohydrate-Active enZymes (CAZymes) who target glycoside linkages on plant cell wall polysaccharides, is one of the virulence factors by which necrotrophic fungi invade host tissues (Cantu et al., 2008). *M. fructicola* exhibits pectinolytic, proteolytic, cellulolytic, xylanolytic, cutinase activities, and toxic molecules on culture media after 28 days in the dark at 25 °C (Garcia-Benitez et al., 2019). *M. fructicola* is known to secrete several enzymes, which can hydrolyse pectins, namely polygalacturonases (Chou et al., 2015), pectinesterases (R. Hall, 1971; Wade and Cruickshank, 1992), and cutinase (Lee et al., 2010; Lee and Bostock, 2006; Wang et al., 2000) *in vitro*. This enzymatic machinery works in a synergistic manner to degrade fruit surface and cell walls (Reignault et al., 2008). A total of 403 genes encoding CAZymes were identified in *M. laxa*. Among them, several have been studied such as rhamnogalacturonan acetyl esterases (MIRGAE1), polygalactouronases (MIPG1 and MIPG2), pectin methyl esterases (MIPMEs), rhamnogalacturonan hydrolases (MIRG-HYDs), 3 members of the rhamnosidase family (Ml α RHA2, Ml α RHA3, and Ml α RHA6), and pectin lyases (MIPNL3) *in vitro* (Baró-Montel et al., 2019a; Rodríguez-Pires et al., 2020a). A core-exoproteome among *M. laxa* isolates included several well-known virulence factors involved in host-tissue factors like

cutinase, polygalactouronases, pectin methyl esterases, pectinlyases, or necrosis-inducing peptide 1 NEP-like (Rodríguez-Pires et al., 2020b). Furthermore, a non-ribosomal peptide synthase (NRPS) together with other five co-regulated genes, forms a secondary metabolism cluster potentially involved in the production of epipolythiodioxopiperazine (ETP) toxin in *M. laxa* (Villarino et al., 2022)

Environmental conditions, such as temperature, humidity, pH and stages of maturity, affect the infection process of *M. fructicola* on fruit (Garcia-Benitez et al., 2017; Lee and Bostock, 2006). Recent studies reported the effect of full-spectrum light on nectarine brown rot development. Light increased the incidence of the disease in *M. fructicola* at the first 3 days of incubation compared to nectarines incubated in the dark (Balsells-Llauradó et al., 2021). However, full-spectrum light had a negative effect on vegetative growth and the asexual development of *M. fructicola* on potato dextrose agar (Astacio et al., 2023). When nectarines are artificially infected with *M. laxa* or *M. fructicola* and subjected to different light wavelengths (white, black, blue, red, far-red) for 7 days, the virulence was only reduced under black light vs nectarines incubated in the dark (Verde-Yáñez et al., 2022). Although light has been identified as another important environmental factor in the development of brown rot, very little is known about the influence of light on the extensive repertoire of genes encoding proteins to facilitate the host infection and colonization by *M. fructicola* in the early fruit infection stages. Only light photoreceptor *vvd1* and *far1* genes are known as highly induced by full-spectrum light by *M. fructicola* 38C after light pulses for 5 min and 14 h in early peach infection (Astacio et al., 2023). At those time points, disease symptoms were not yet visible on any inoculated fruit after the incubation and irradiation period, nor with the control group in continuous darkness.

In an effort to unravel the molecular intricacies underlying the early stages of *M. fructicola* infection, in this study we examine the transcriptional profile of a select group of cell wall degrading enzymes (CWDEs) used by the pathogen to penetrate the fruit surface and establish colonisation within the internal tissues. Our primary objective is to determine how changes in the expression levels of key fungal genes involved in the process of plant cell wall degradation affect brown rot development, while assessing the impact of different light wavelengths on disease progression. This comprehensive investigation includes both fruit-based assays and various synthetic culture media,

providing a holistic perspective on the multiple interactions that govern the infection process.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 *Monilinia fructicola* strain 38C

38C is a *Monilinia fructicola* single-spore isolate, belonging to the culture collection of the Plant Protection Department of INIA-CSIC (Madrid, Spain). Our laboratory had previously used *M. fructicola* strain 38C as model organism to understand peach-*M. fructicola* interaction (Rodríguez-Pires et al., 2019). Strain 38C genome is available under the accession number GCA_016906325.1 at NCBI.

For long term storage, strain 38C was maintained as a conidial suspension in 20% glycerol and frozen at -80°C. Potato Dextrose Agar (PDA Difco™, New Jersey, USA) cultures in darkness at 4 °C were used for short-term storage. For conidia production, PDA cultures grown at 25 °C for 7 days in complete darkness were used.

2.2 *M. fructicola* growth in different culture conditions under different light wavelengths

Influence of red and blue fluorescent light, generated by using a set of 4 fluorescent bulbs of F36W/T8/Red Sylvania and F36/T8/B Sylvania fluorescent bulbs, respectively, was tested on the growth rate and conidia production for *M. fructicola* strain 38C. Influence of red and blue fluorescent light on disease development and the expression profile of genes involved in the nectarine cell wall degradation process in the very early stages of *Monilinia* spp. fruit infection over nectarines was tested. Also, gene expression was measured in mycelia grown in different synthetic culture media, namely potato dextrose broth (PDB) and distilled water supplemented with 1% (by weight) lyophilized and pulverized nectarine skin, named from now on 1% nectarine.

We used the same procedures and photoperiods as authors described in Astacio et al., (2023) for the growth, conidiation assays and *In Vivo* nectarine infection assays. Sanitized, unwounded nectarines (var. Red Jim) were inoculated with three 15µl droplets of a suspension containing 10⁶ conidia/ml from *M. fructicola* 38C and placed on disinfected cellulose alveoli inside plastic containers, each one containing three biological replicates. Then, inoculated fruit was cultured for 24 h in the dark to allow for conidial

germination. The above mentioned red and blue light tubes were used for the differential light conditions.

For the synthetic media cultures, flasks containing PDB or 1% nectarine were inoculated with conidia from *M. fructicola* 38C, to a final concentration of 10^6 conidia ml⁻¹ and incubated in darkness at 22 °C for 24h in rotatory culture at 150 rpm, to allow for conidial germination. Lights were then turn on and samples were taken at 5 minutes, 1, 2.5, 5 and 14h of uninterrupted illumination. Then, mycelium was collected by centrifuging the flask contents at 12000 rpm for 15 minutes at 4 °C. Supernatant was discarded and pellet promptly frozen in liquid nitrogen. Control group was set in total darkness and three biological replicates were used.

2.3 Total RNA extraction

Total RNA of *M. fructicola* was extracted from infected fruit tissues or recovered pellets from previously described experiments according to the rapid CTAB-based protocol described by Gambino et al., (2008), adapted to *Monilinia* spp. as described in Rodríguez-Pires et al., (2021a). A TRIreagent based method was used (Sigma–Aldrich, St Louis, MO, USA) as described in Espeso et al., (2019) to extract total RNA from strain 38C mycelium recovered from PDB.

In both cases, Total RNA was resuspended in RNase free Mili-Q water and frozen immediately using liquid nitrogen and kept at -80 °C. RNA integrity was checked by 1.2% agarose gel electrophoresis, and purity and concentration were measured using a NanoDrop 2000 spectrophotometer.

2.4 Gene expression analysis

Gene expression was measured using standardized RT-qPCR protocols. DNase 1 (Invitrogen, Carlsbad, USA) following manufacturer's instructions was used to treat total RNA samples prior to cDNA synthesis. 1µg of DNase- treated RNA was used as template and SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR and oligo(dT) primer (Invitrogen, Carlsbad, USA) were used for cDNA synthesis. Real-time PCR was performed with a 7500 Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems, Foster City, USA) using GoTaq qPCR Master Mix (Promega, Madison, USA). We used the cycling program described in Astacio et al., (2023). Primers for histone H3 gene (MI_histoneH3) (BK012065) were used from (Rodríguez-Pires et al., 2020a), primers for

poligalacturonase 1 and 6 (*pgl* and *pg6*), pectil metilesterase 3 and 2 (*pme3* and *pme2*) pectate lyase 1 and 2 (*pnl1* and *pnl2*), cutinase 1 (*cut1*), cellulase 1 (*cell1*) and necrosis-inducing factor 2 (*nep2*) were designed using Vector NTI (Thermo Fisher, Waltham, USA) and MEGA X (Kumar et al., 2018) (Table 1) Primers for photoreception related genes *vvd1* and *far1* were also used from (Astacio et al., 2023) as control of photoactivation.

2.5 Statistical analysis

Data from growth rate and conidiation experiments was analysed by a multiway and single way analysis of variance. When F-test was significant at $p \leq 0.05$, the means were compared using Tukey's multiple range test.

Gene expression levels were calculated using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method (Schmittgen and Livak, 2008) using the 5min samples for each light wavelength as controls, measuring how gene expression evolves with irradiation over time. In this way we can compare whether a given gene increases or decreases its expression levels in response to light with respect to how it is expressed when the fungus is in continuous darkness conditions.

Table 1. Primers used in this study.

Gen	Primer name	Sequence (5'-3')	Tm (°C)	%GC	Amplicon lenght (bp)
<i>pnl1</i>	Mfcpl1F	CACAACAACGTCTCCGATGGTAT	55.4	47.8	227
	Mfcpl1R	GCCTTGACCTTGCTGCTTCC	56.2	60	
<i>pnl2</i>	Mfcpl2F	TCCTCCACGCTGTCAACAACACT	54.5	52.4	222
	Mfcpl2R	AAGAACCGAAACCGTTGACTTG	54.9	45.5	
<i>pme3</i>	MfcPEC1F	GGTGCCCAATCTGTCTACCTTG	55.0	54.5	242
	MfcPEC1R	CTACCCAAGAGTTCACCGATGG	55.1	54.5	
<i>pme2</i>	MfcPEC2F	GCCATCACCGCCTCTGGT	55.5	66.7	222
	MfcPEC2R	GTCGGTGTTTGCGGTAGAGGT	55.5	57.1	
<i>pg6</i>	MfcPG6F	GCGTAGCCATTACAAGCGGA	55.3	55.0	186
	MfcPG6R	CGGTGGTGTGAAGTTGGTCTT	55.4	50.0	
<i>cell1</i>	MfcCEL1F	GTGGTGCTGGACCAATCTCAA	54.7	52.4	222
	MfcCEL1R	CTTGGATTGTTGTGAGGATTTGG	55.0	43.5	
<i>pgl</i>	MfcPG1F	CCAAGTACGGTGTGTGCATCCA	54,7	50	233
	MfcPG1R	TTGACACCAGATGGGAGACCA	55	52,4	

<i>cut1</i>	Mfccut1F	GGCCAAACAACCTCCAGCC	54,4	57,9	289
	Mfccut1R	AACTTGCTTGACGAAAGCGG	54,6	50	

3. RESULTS

3.1 Red and blue light modify mycelial growth and conidia formation on PDA

M. fructicola 38C was tested for growth rate and sporulation under different photoperiods of red and blue fluorescent light, using continuous darkness as a control group. *M. fructicola* strain 38C growth rate and sporulation were significantly influenced by red and blue fluorescent light when compared to continuous darkness in our study conditions (figure 1).

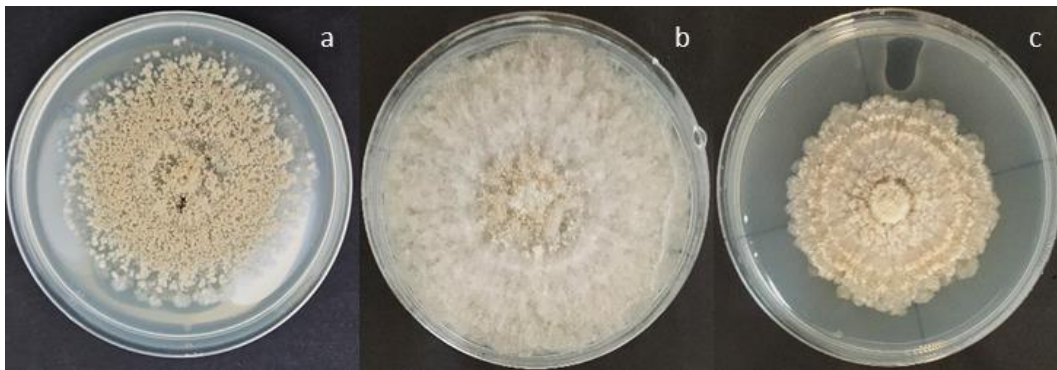


Figure 1. Colonial growth of *M. fructicola* strain 38C after seven days of culture in (a) continuous darkness, (b) 12 h red light/ 12 h darkness photoperiod and (c) 12 h blue light/ 12 h darkness photoperiod.

A significant difference in the growth rate of 38C when exposed to red and blue light was found. Red light always produced a severe reduction in conidia formation (figure 2A and C) while only promoting 38C growth rate on the photoperiod with 12 h of light exposure (figure 2B). Blue light had a totally different effect on growth rate and sporulation, reducing conidia production on the photoperiod with more hours of light exposure (figure 2A), but always inducing a reduction in growth rate (figure 2B and D).

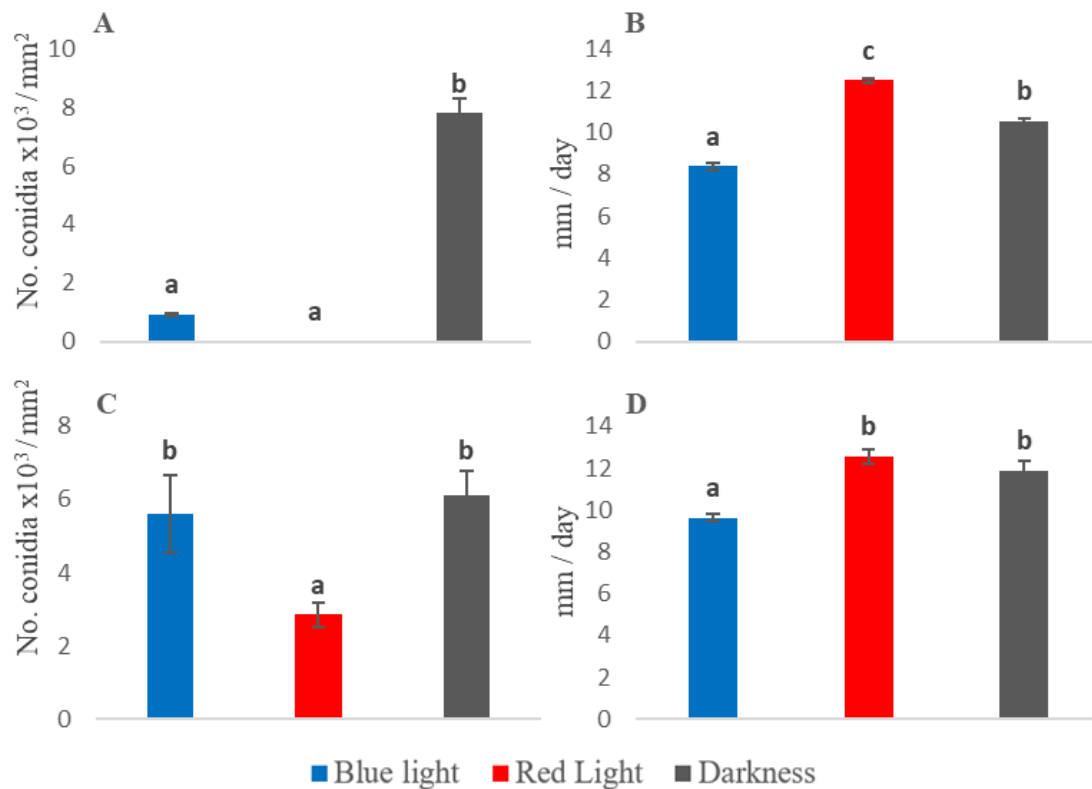


Figure 2. Effect of two different red and blue light photoperiods on mycelial growth rate and sporulation on *M. fructicola* strain 38C after seven days of incubation. (A) conidia production of 38C under red and blue light in a 12 h light/12 h darkness photoperiod; (B) growth rate of 38C under red and blue light in a 12 h light/12 h darkness photoperiod; (C) conidia production of 38C under red and blue light in an 8 h light/16 h darkness photoperiod; (D) growth rate of 38C under red and blue light in an 8 h light/16 h darkness photoperiod. Data is represented as the mean and standard error from two experiments. Bars with same letter in each graph were not significantly different by Tukey's multiple range test.

The 12 h light/12 h darkness photoperiod had greater effects on sporulation than the 8 h light/16 h darkness one. Red light produced a significant reduction in conidia formation by 38C in the 8 h light/16 h darkness photoperiod while the blue light caused no significant effects. In contrast, both blue and red light caused severe loss of conidia formation on the 12 h light/12 h darkness photoperiod, with red light completely inhibiting sporulation (figure 2 C and D).

3.2 Disease development on nectarines under red and blue light

To analyse the influence of red and blue light over the early stages of disease development and infection process, inoculated nectarines were incubated under red and blue fluorescent light and a control group was kept in total darkness. As expected, no symptoms of disease were observed on the control group, which typically has an

incubation period of two to three days before symptoms of early infection appear. We found that compared to continuous darkness, both red and blue light accelerated the appearance of brown rot disease symptoms on nectarines (figure 3 a, b and c). After 14 hours post-illumination, tissue maceration was visible in 50% and 66.67% of inoculation spots under both blue and red light, respectively (figure 3d). Tissue maceration or any other disease symptoms were not detected on blue or red light prior to 14 h post-illumination.

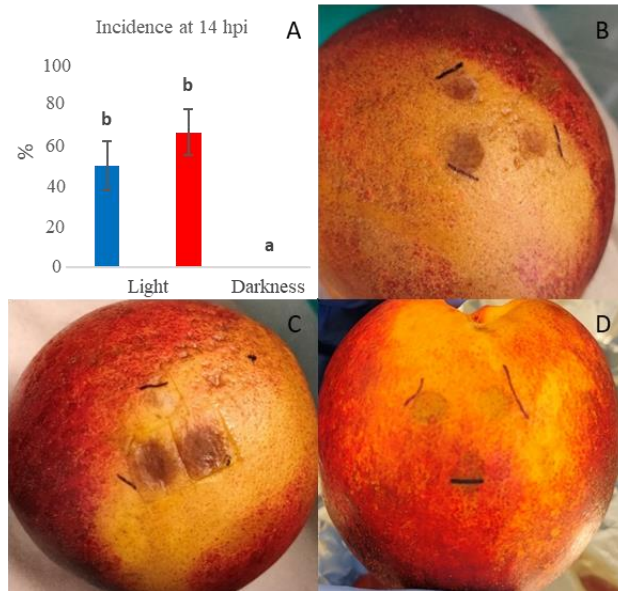


Figure 3. (A) Incidence of brown rot at 14 h post-illumination for each light. Data is represented as the mean and standard error from two experiments with three biological replicates each. Effect of (B) red light, (C) blue light and (D) darkness on early stages of disease development by *M. fructicola* strain 38C. Incubation period was 38 h, with 24 h at 22 °C at darkness and 14 h of uninterrupted illumination in (B) and (C).

3.3 Red and blue light impact regulation of genes involved in the cell wall degrading process on fruit and synthetic medium

As described before, red and blue light have an impact on development speed of the disease on early stages of fruit infection and colonization. These results point out to light-induced differences in the regulation pattern of genes involved in the cell wall degrading process. To test this hypothesis, gene expression was measured by RTqPCR on samples obtained from 38C grown on differential light and culture conditions.

To study the effect of exposure to red or blue light, *M. fructicola* strain 38C was grown in different media. Conidia were inoculated on nectarine surface, PDB and in 1%

nectarine (a water solution of 1% of crushed nectarine skin). Exposed to red or blue light, samples were taken at 5 min, 1, 2.5, 5 and, 14 h post-illumination. As a control, samples incubated in continuous darkness were collected at the same times.

As an initial test we determined if transcriptional control dependent on blue and red light exists in *M. fructicola* 38C (our system). For this purpose, *vvd1* and *far1*, two white light photoactivation-related genes were newly studied (Astacio et al., 2023). Figure 3 shows that both genes displayed significant upregulation by blue light in PDB when compared to the control group. *far1* was also induced by blue light in 1% nectarine and on the contrary, substantially repressed by red and blue light at 14 h post-illumination over nectarine surface. These results suggested that 38C was able to respond to light stimulation in all culture media, and that these play an important role in the regulation of fungal gene expression. (figure 3).

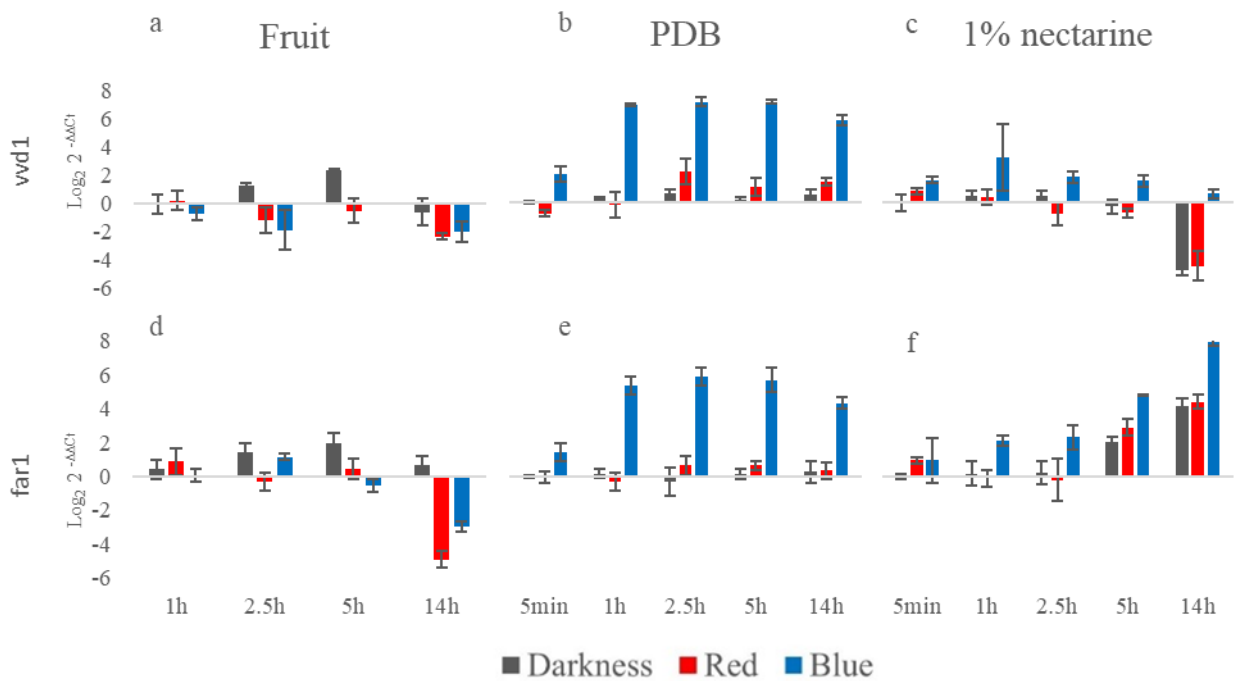


Figure 3. Changes on relative gene expression of photoreception related genes *vvd1* on (a) fruit, (b) PDB and (c) 1% nectarine and *far1* on (d) fruit, (e) PDB and (f) 1% nectarine broth. The scale is $\text{Log}_2 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ of mean fold change values, including standard error, from three separate experiments using the $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ method (Schmittgen and Livak, 2008), with histone H3 as endogenous control gene.

Once determined that 38C responds to light stimulus in all the tested culture media, we extended our study to measure the effects of red and blue lights on the expression levels of our selected group of CWDEs in 38C. We found that both lights significantly modified the expression levels of the eight genes studied against darkness conditions (Figures 5 to

7). In addition, culture medium also had a great impact on the expression of these genes, where almost no differential expression of the selected genes was found when 38C grew on PDB, except *cut1*, which showed photoinduction under blue light after 2.5 and 5 h. Furthermore, the red and blue lights induced the transcription of different genes depending on whether the isolate was growing on fruit or on synthetic media with 1% lyophilized and pulverized nectarine skin.

Most notably, red and blue light induced expression of carbohydrate esterase genes *pme3* on fruit, and 1% nectarine at 14 h post-illumination (figure 4a and c), while *pme2* was mainly photoinduced on fruit (figure 4d). In addition to this, *cut1*, the main cutinase of *M. fructicola* (Lee et al., 2010), was, unexpectedly, heavily repressed by both lights on fruit and 1% nectarine but was being photoinduced by blue light on PDB and 1% nectarine (figure 4g, h and i).

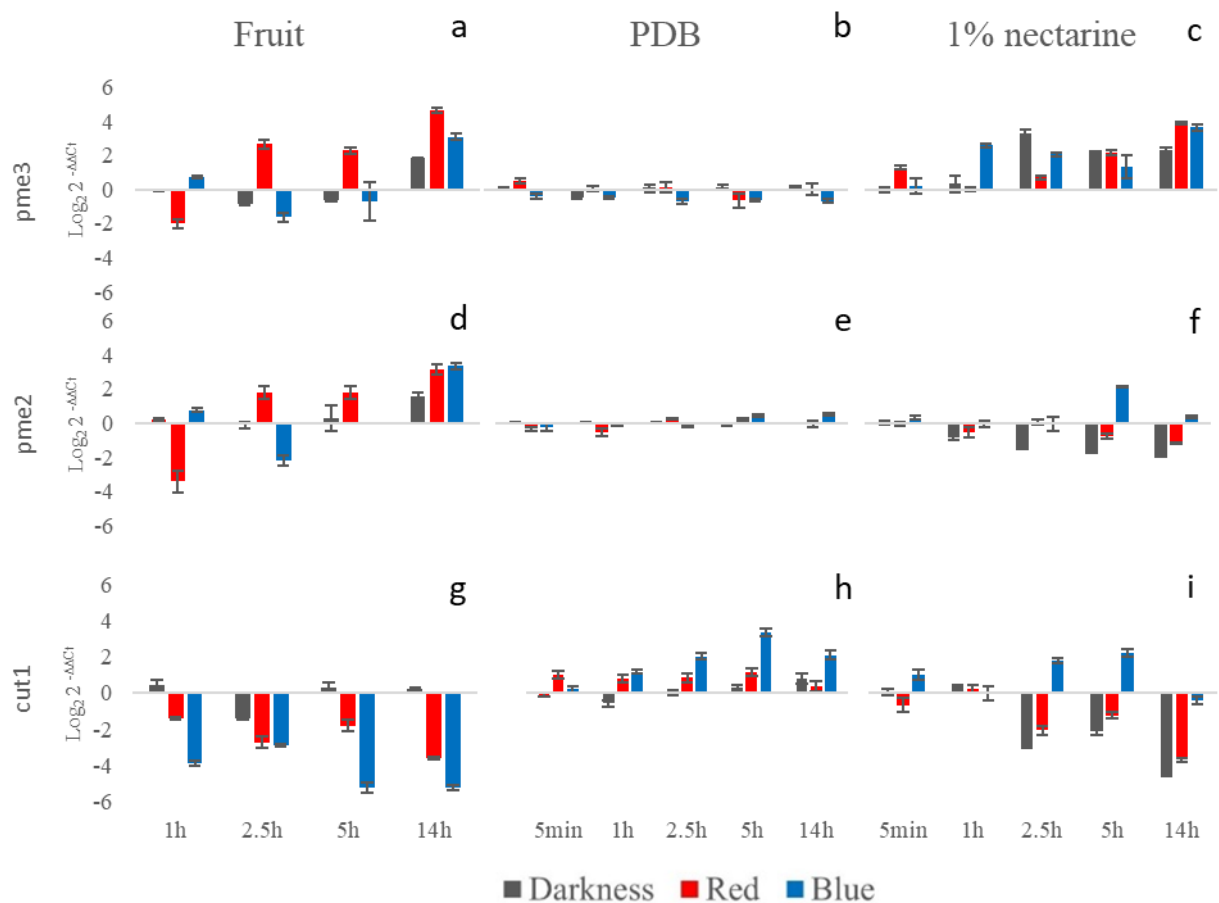


Figure 4. Changes on relative gene expression of genes *pme3* on (a) fruit, (b) PDB and (c) 1% nectarine; *pme2* on (d) fruit, (e) PDB and (f) 1% nectarine; and *cut1* on (g) fruit, (h) PDB and (i) 1% nectarine. The

scale is $\text{Log}_2 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ of mean fold change values, including standard error, from three separate experiments using the $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ method (Schmittgen and Livak, 2008), with histone H3 as endogenous control gene.

Expression levels of polygalacturonase *pgl* and cellulase *cell* genes showed a low photoinduction by red lights on fruit, barely reaching statistical significance (figure 5 a and d). We also found a significant difference in the expression of *pgl* at 5 h under blue light compared to the control group in 1% nectarine (figure 5c). Likewise, red light caused significant differences in expression when compared to continuous darkness at 14 hpi (figure 5c). Furthermore, expression of *cell* showed significantly photoactivation by blue light at 1 and 14 hpi in 1% nectarine, and just by red light at 5 min post irradiance (figure 5f).

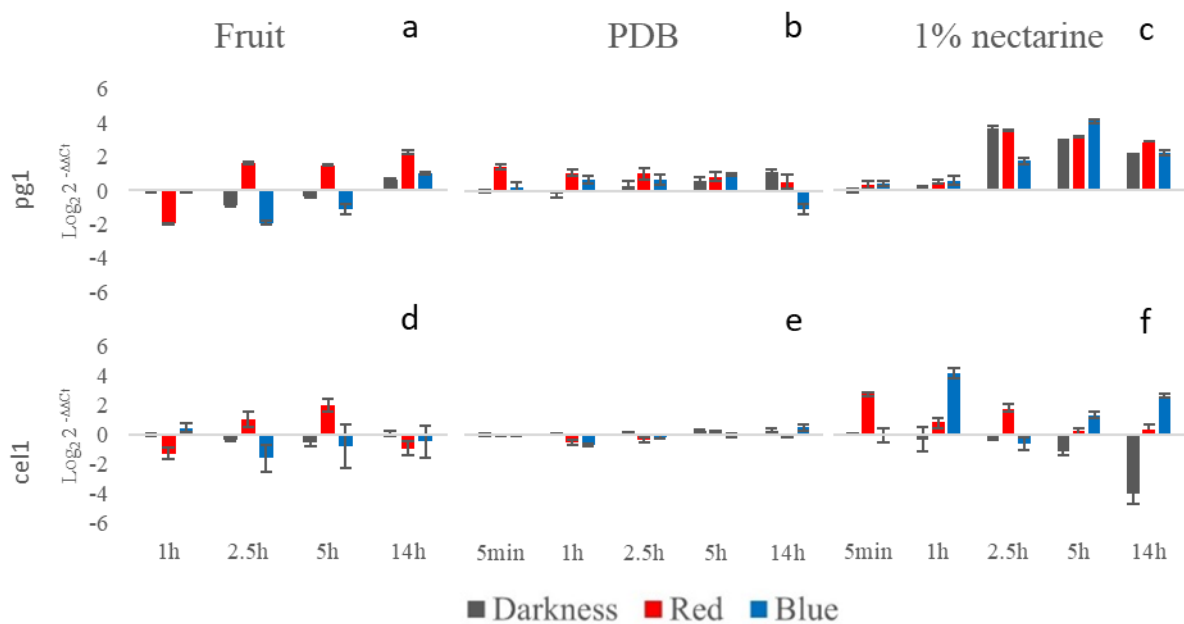


Figure 5. Changes on relative gene expression of genes *pgl* on (a) fruit, (b) PDB and (c) 1% nectarine; *cell* on (d) fruit, (e) PDB and (f) 1% nectarine. The scale is $\text{Log}_2 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ of mean fold change values, including standard error, from three separate experiments using the $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ method (Schmittgen and Livak, 2008), with histone H3 as endogenous control gene.

The expression levels of the PLs *pnl1* and *pnl2* were also photoinduced, although with differences depending on the culture medium (figure 6). These PLs were the CAZymes of choice by 38C when growing in 1% nectarine and were heavily photoinduced by red and blue light (figure 6c and f). The light photoinduction of PL on fruit was different, and only *pnl1* under red light and *pnl2* under blue light at 5 h post-illumination showed

statistically significant upregulation, while blue light induced a strong repression of *pnl1* (figure 6a and d).

These results pointed out that different conditions on culture media might determine which CAZyme is used in a joint fashion with light in a complex regulatory network.

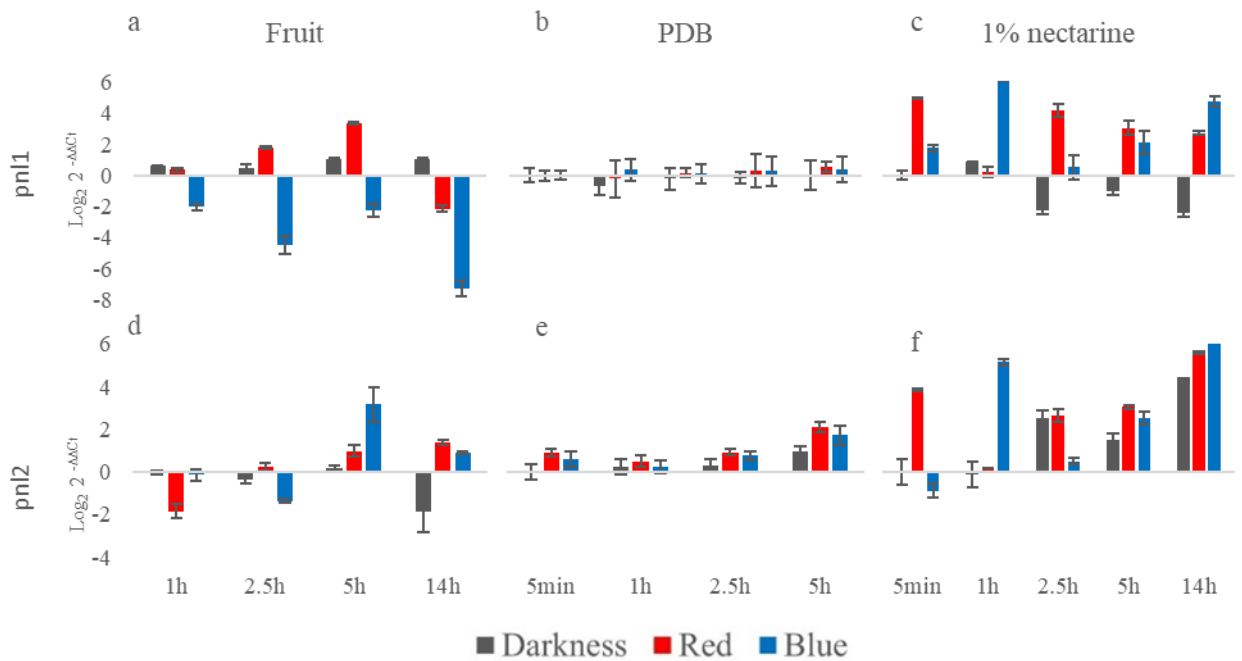


Figure 6. Changes on relative gene expression of genes *pnl1* on (a) fruit, (b) PDB and (c) 1% nectarine; and *pnl2* on (d) fruit, (e) PDB and (f) 1% nectarine. The scale is $\text{Log}_2 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ of mean fold change values, including standard deviation, from three separate experiments using the $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ method (Schmittgen and Livak, 2008), with histone H3 as endogenous control gene.

3.4 Red and blue light induce the expression of nep1-like protein NEP2 during early stages of infection

The Nep1-like protein coding gene *nep2* was strongly photoinduced by red light from very early exposure times when 38C strain grew over the fruit surface. $\text{Log}_2 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ values ranged between 4.8 and 5.5 at 2.5, 5 and 14 h post-illumination (figure 7a). Blue light also induced *nep2* gene expression, although the photoinduction by blue light was slightly behind in time and intensity, only starting at 5 h post-illumination and reaching a maximal $\text{Log}_2 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ value of 4.6 at 14 h post-illumination (figure 7a). Expression levels of *nep2* also raised in the control group, which was kept in total darkness. At 14 h post-illumination we found statistically significant increase (figure 7a). This result was expected because artificial infections of nectarines with *M. fructicola* usually take two to

three days to show symptoms of disease, and one role of Nep1-like proteins is to induce necrosis in host tissues. We found that red and blue lights caused no statistically significant differences in *nep2* gene expression when compared to the control group in PDB or 1% nectarine. (figure 7b and c), meaning that media culture plays a major role in the gene regulation of this NEP1-like protein.

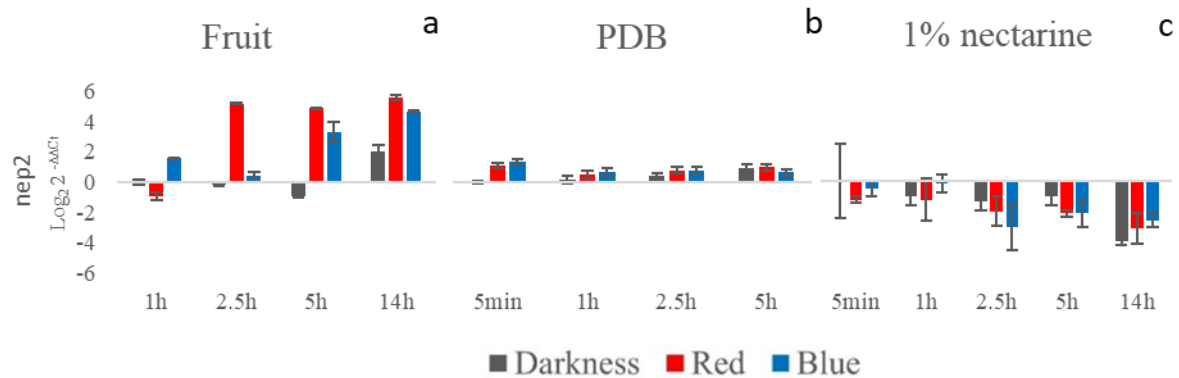


Figure 7. Changes on relative gene expression of gene *nep2* on (a) fruit, (b) PDB and (c) 1% nectarine. The scale is $\text{Log}_2 2^{-\Delta\Delta C_t}$ of mean fold change values, including standard deviation, from three separate experiments using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method (Schmittgen and Livak, 2008), with histone H3 as endogenous control gene.

4. DISCUSSION

Red and blue light seem to increase incidence and accelerate the process of infection in early stages of *Monilinia fructicola* 38C pathogenesis on fruit. These lights also caused an increase of brown rot incidence for *M. laxa* and *M. fructicola* (Verde-Yáñez et al., 2022), and only red light in nectarines inoculated with three different *M. laxa* isolates (Rodríguez-Pires et al., 2021), both in very late infection time after 7 days of incubation. In this article we described a set of CWDEs that alter their gene expression values in response to red and blue light when compared to the darkness control group during nectarine colonization. Genes such as *pme3*, *pme2*, *pnl1*, *pnl2* and, *nep2*, and to a lesser extent *pgl* and *cell*, may play a role in enhancing the ability of the fungus to penetrate the nectarine skin and accelerate the early infection process, and they appear to do so in a light-dependent manner. Baró-Montel and collaborators demonstrated that the pectin methylesterase gene *pme2* is a virulence factor of *M. laxa*. They also showed that the presence of pectine in the medium is important for the expression of *pme2* and that *MIPME2* and *MIPME3* are key to the degradation of the host cell wall in vivo (Baró-

Montel et al., 2019). The homologous gene in *B. cinerea*, *BcPME2*, was also among the most expressed genes when infecting various host tissues, while *BcPG1* was the most expressed CAZyme (Blanco-Ulate et al., 2014). *MIPG1* and *MIPNL2* were also activated by the presence of pectin in the culture media (Rodríguez-Pires et al., 2020b). These two genes were then also tested for photoinduction, and significant up-regulation of *MIPNL2* was found as an early response for high-intensity full spectrum light irradiation after inoculation in early and late varieties of cherry cultivars (Rodríguez-Pires et al., 2021). We also found that the cellulase gene *cell* was being expressed and influenced by red light. Very little is known about the regulation process of this family of genes in *Monilinia* spp, but during the infection process of *B. cinerea*, it was reported that fifteen cellulose genes were expressed (Blanco-Ulate et al., 2014). This is a small representation of all the CWDEs encoded in the genome of *Monilinia* spp. Further analysis is required to better understand how light influences the development of brown rot and the specific role of these genes and enzymes in it.

Another key regulator of CAZymes gene expression is CRE1, the major transcription factor of carbon catabolite repression, who serves to avoid biosynthesis of enzymes for assimilation of alternative carbon sources in the presence of easily metabolizable carbon sources such as glucose or acetate (Louise Glass et al., 2013). In *Trichoderma* spp. there is a connection between light response machinery and nutrient signalling pathways, including CAZymes regulation (Schmoll, 2018). ENV1, homologous of BcVVD1, is involved on regulation of cellulose and several glycoside hydrolases gene expression via the heterotrimeric G-protein pathway (Tisch et al., 2011) and cAMP pathway (Schmoll, 2018). Similar discoveries were also made in the model organism *N. crassa*, where CRE1 was shown to be a target of VVD1 photoadaptation (Schmoll et al., 2012). In Astacio et al., (2023), *vvd1* is shown to have an early, strong and consistent light upregulation in *M. fructicola* and, in this study, we found that *vvd1* and *far1* are both susceptible to blue light stimulus. Further research is needed to establish the relation between this photoreception related genes and light response of CAZymes in *M. fructicola*.

The NEP1-like protein coding gene *nep2* was also shown to be highly responsive to red and blue light during the early stages of brown rot development by 38C. NEP1-like proteins are a complex family of secreted effectors of phytopathogens that act as toxin-like virulence factors, inducing necrosis and triggering plant immune responses first identified in *Fusarium oxysporum* (Bailey, 1995; Pirc et al., 2023). *Ssnep2*, the

homologous gene in *S. sclerotium*, is necessary for pathogenicity, as shown in Yang et al., (2022). Deletion of *Ss nep2* significantly reduced pathogenicity and the complemented strain recovered wild-type phenotype. NEP1-like proteins act as virulence factors in other pathosystems as well, as demonstrated by Santhanam et al., (2013) for *Verticillium dahliae* and tomato/Arabidopsis plants. Secretion of NEP1-like proteins is a target for development of novel phytopharmaceutical compounds, as they are secreted by many plant pathogens including bacteria, fungi and oomycetes (Pirc et al., 2021). Oomycetes carry in their genome multiple genes encoding for different NEP1-like proteins, upwards of 50, like in *Phytophthora ramorum* (Bae et al., 2005), but it is common that only a few are expressed during infection. This has been observed in *Moniliophthora perniciosa* during withes' broom disease in cocoa (Zaparoli et al., 2011) and *Phytophthora sojae* causing stem and root rot in soybean (Gijzen and Nürnberger, 2006). In both of this pathosystems, *nep2* is the preferred NEP1-like protein coding gene to express during infection. Very little is known about the regulatory mechanisms controlling the expression of genes encoding NEP1-like proteins. Here, we show that expression of *M. fructicola* 38C *nep2* is induced by red and blue light on the fruit surface, but not in PDB nor 1% nectarine. This could also help to explain the increased incidence of brown rot in those light conditions.

An additional interesting finding in this study is the fact that culture media played a major role in deciding what genes are active during the early stages of infection by *M. fructicola* 38C. De Cal et al., (2013) described how *M. fructicola* can acidify the host's tissues by secreting gluconic acid and up-regulate the expression of PGs. PME's have also been shown to be pH sensitive (Pelloux et al., 2007). In *M. laxa*, pH plays a role in regulating the gene expression of PME's and their performance (Baró-Montel et al., 2019). This behaviour may be regulated by zinc finger transcription factor PacC, which is involved in regulation of pH-controlled genes in filamentous fungi (Peñalva et al., 2008), up-regulating alkaline expressed genes and downregulating acid-expressed ones (Alkan et al., 2013). Here we find that PME's are also inducible by red or blue light while behaving differently depending on the culture media. Synthetic culture media like PDB and 1% nectarine may not be susceptible to the same mechanism that acidify the environment when *M. fructicola* is invading nectarine tissue, so a mechanism that coordinates pH and light regulation might come into play. External factors that are difficult to control, such as the seasonality of agricultural production, level of fruit maturity, or the obligate

pathogen status of many necrotrophic fungi such as *Monilinia* spp. need to be taken into account. The possibility that a synthetic culture medium, generated from lyophilized and pulverised nectarine peel, could supplement the need for fruit at optimum maturity. However, it has been demonstrated that the conditions that occur on the surface of the fruit during the infection process are not reproducible in this way.

Light is an environmental source of information that constantly and periodically changes in intensity and quality due to earth's rotation and refraction of light as it passes through the atmosphere. It is therefore an evolutionary advantage for fungi to be able to detect these changes and develop a response (Mooney and Yager, 1990; Schumacher et al., 2012). Light of different wavelengths has different effects on filamentous fungi, ranging from, but not limited to, activating conidiation and repressing sexual development (Bayram et al., 2010; Dasgupta et al., 2016; Schumacher, 2017); inducing differentiation from primordium into fruiting body, (Huang et al., 2020; Xie et al., 2018), regulation of secondary metabolism (Bayram et al., 2016; Idnurm and Crosson, 2009), production of mycotoxins (Kim et al., 2013; Schmidt-Heydt et al., 2011) and pathogenicity (Cerón-Bustamante et al., 2023; Pérez-Lara et al., 2023; Rodríguez-Pires et al., 2021b).

Red and blue light influenced developmental processes, such as growth and sporulation, in *M. fructicola* 38C. Red light induced colony growth rate in a 12 h photoperiod in a similar fashion as described in (Rasiukevičiūtė et al., 2021) for *B. cinerea*. Red light also reduced conidiation in both photoperiods in 38C, while it caused an increase on sporulation in *M. laxa* 8L (Rodríguez-Pires et al., 2021) and *A. alternata* (Igbalajobi et al., 2019). Red and far-red wavelengths play a role in conidia production in *M. fructicola*, by elevating the expression of *REG1* and *C6TF1* genes (Verde-Yáñez et al., 2022). Blue light was detrimental to the growth rate of 38C in both photoperiods tested, and greatly reduced conidia formation in the 12 h light photoperiod. This is consistent with the literature, as blue light is recognized for its negative effects on *in vitro* fungal development (De Lucca et al., 2012; Trzaska et al., 2017). For example, blue light inhibits *B. cinerea* growth in a 12h photoperiod (Xu et al., 2017) and suppresses conidiation in *B. cinerea* (Rasiukevičiūtė et al., 2021) and in *P. digitatum* (Liao et al., 2013).

Overall, our results indicate that red and blue light accelerate the onset of disease symptoms compared to darkness, and that a select group of CWDEs coding genes, including CAZymes and *nep2*, are overexpressed during early nectarine infection in response to red and blue light, enhancing the ability of the fungus to penetrate and

colonize the nectarine. These results suggest that light plays an active role in regulating disease development and that CAZymes and NEP1-like proteins could be considered as virulence factors for *Monilinia fructicola*.

5. FUNDING

This work was supported by grants PID2020-115702RB468 C21/AEI/10.13039/501100011033; PID2021-124278OB-I00/MCIN/AEI/10.13039/469 501100011033/FEDER, UE, and AGL2017-84389-C2-2-R from 470 (MINECO/AEI/FEDER, UE). J.D. Astacio received a Ph.D. fellowship (PRE2018-471 085721) from the Ministry of Science, Innovation and Universities (Spain).

6. Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

7. CRediT authorship contribution statement

Juan Diego Astacio: Conceptualization, Data curation, Formal Analysis, Investigation, Methodology, Visualization Writing – original draft. **Paloma Melgarejo:** Funding acquisition, Project administration, Supervision, Writing – review & editing. **Antonieta De Cal:** Conceptualization, Methodology, Funding acquisition, Project administration, Supervision, Writing – review & editing. **Eduardo Antonio Espeso** Conceptualization, Methodology, Supervision Writing – review & editing.

8. Data Availability Statement

Publicly available datasets were analysed in this study. These data can be found under the BioProject PRJNA503180.

9. BIBLIOGRAPHY

- Alkan, N., Meng, X., Friedlander, G., Reuveni, E., Sukno, S., Sherman, A., Thon, M., Fluhr, R., Prusky, D., 2013. Global aspects of pacC regulation of pathogenicity genes in *Colletotrichum gloeosporioides* as revealed by transcriptome analysis. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 26, 1345–1358. <https://doi.org/10.1094/MPMI-03-13-0080-R>
- Astacio, J.D., Espeso, E.A., Melgarejo, P., De Cal, A., 2023. *Monilinia fructicola* Response to White Light. *Journal of Fungi* 9. <https://doi.org/10.3390/jof9100988>
- Bae, H., Bowers, J.H., Tooley, P.W., Bailey, B.A., 2005. NEP1 orthologs encoding necrosis and ethylene inducing proteins exist as a multigene family in

- Phytophthora megakarya*, causal agent of black pod disease on cacao. *Mycol Res* 109, 1373–1385. <https://doi.org/10.1017/S0953756205003941>
- Bailey A. Bryan, 1995. Purification of a Protein From Culture Filtrates of *Fusarium oxysporum* that Induces Ethylene and Necrosis in Leaves of *Erythroxylum coca*. *Phytopathology* 85, 1250–1255.
- Balsells-Llauradó, M., Torres, R., Vall-llaura, N., Casals, C., Teixidó, N., Usall, J., 2021. Light Intensity Alters the Behavior of *Monilinia* spp. in vitro and the Disease Development on Stone Fruit-Pathogen Interaction. *Front Plant Sci* 12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.666985>
- Baró-Montel, N., Vall-llaura, N., Usall, J., Teixidó, N., Naranjo-Ortíz, M.A., Gabaldón, T., Torres, R., 2019. Pectin methyl esterases and rhamnogalacturonan hydrolases: weapons for successful *Monilinia laxa* infection in stone fruit? *Plant Pathol* 68, 1381–1393. <https://doi.org/10.1111/ppa.13039>
- Bayram, Ö., Braus, G.H., Fischer, R., Rodriguez-Romero, J., 2010. Spotlight on *Aspergillus nidulans* photosensory systems. *Fungal Genetics and Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2010.05.008>
- Bayram, Ö., Feussner, K., Dumkow, M., Herrfurth, C., Feussner, I., Braus, G.H., 2016. Changes of global gene expression and secondary metabolite accumulation during light-dependent *Aspergillus nidulans* development. *Fungal Genetics and Biology* 87, 30–53. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2016.01.004>
- Blanco-Ulate, B., Morales-Cruz, A., Amrine, K.C.H., Labavitch, J.M., Powell, A.L.T., Cantu, D., 2014. Genome-wide transcriptional profiling of *Botrytis cinerea* genes targeting plant cell walls during infections of different hosts. *Front Plant Sci* 5. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00435>
- Byrde, R.J.W., Willetts, H.J., 1977. TAXONOMY AND NOMENCLATURE, in: *The Brown Rot Fungi of Fruit*. Elsevier, pp. 15–31. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-019740-1.50009-5>
- Cantu, D., Vicente, A.R., Labavitch, J.M., Bennett, A.B., Powell, A.L.T., 2008. Strangers in the matrix: plant cell walls and pathogen susceptibility. *Trends Plant Sci* 13, 610–617. <https://doi.org/10.1016/J.TPLANTS.2008.09.002>
- Cerón-Bustamante, M., Balducci, E., Beccari, G., Nicholson, P., Covarelli, L., Benincasa, P., 2023. Effect of light spectra on cereal fungal pathogens, a review. *Fungal Biol Rev* 43, 100291. <https://doi.org/10.1016/J.FBR.2022.10.004>
- Chou, C.M., Yu, F.Y., Yu, P.L., Ho, J.F., Bostock, R.M., Chung, K.R., Huang, J.W., Lee, M.H., 2015. Expression of five endopolygalacturonase genes and demonstration that *MfPG1* overexpression diminishes virulence in the brown rot pathogen *Monilinia fructicola*. *PLoS One* 10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132012>
- Dasgupta, A., Fuller, K.K., Dunlap, J.C., Loros, J.J., 2016. Seeing the world differently: Variability in the photosensory mechanisms of two model fungi. *Environ Microbiol*. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13055>

- De Cal, A., Sandín-España, P., Martínez, F., Egüen, B., Chien-Ming, C., Lee, M.H., Melgarejo, P., Prusky, D., 2013. Role of gluconic acid and pH modulation in virulence of *Monilinia fructicola* on peach fruit. *Postharvest Biol Technol* 86, 418–423. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2013.07.012>
- De Lucca, A.J., Carter-Wientjes, C., Williams, K.A., Bhatnagar, D., 2012. Blue light (470 nm) effectively inhibits bacterial and fungal growth. *Lett Appl Microbiol* 55, 460–466. <https://doi.org/10.1111/lam.12002>
- Espeso, E.A., Villarino, M., Carreras, M., Alonso-Guirado, L., Alonso, J.M., Melgarejo, P., Larena, I., 2019. Altered nitrogen metabolism in biocontrol strains of *Penicillium rubens*. *Fungal Genetics and Biology* 132. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2019.103263>
- G. C. Wade, R. H. Cruickshank, 1992. Rapid Development of Resistance of Wounds on Immature Apricot Fruit to Infection with *Monilinia fructicola*. *Journal of Phytopathology* 136, 89–94.
- Gambino, G., Perrone, I., Gribaudo, I., 2008. A rapid and effective method for RNA extraction from different tissues of grapevine and other woody plants. *Phytochemical Analysis* 19, 520–525. <https://doi.org/10.1002/pca.1078>
- García-Benitez, C., Melgarejo, P., De Cal, A., 2017. Fruit maturity and post-harvest environmental conditions influence the pre-penetration stages of *Monilinia* infections in peaches. *Int J Food Microbiol* 241, 117–122. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.09.010>
- García-Benitez, C., Melgarejo, P., De Cal, A., Fontaniella, B., 2016. Microscopic analyses of latent and visible *Monilinia fructicola* infections in nectarines. *PLoS One* 11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160675>
- García-Benitez, C., Melgarejo, P., Sandin-España, P., Sevilla-Morán, B., De Cal, A., 2019. Degrading enzymes and phytotoxins in *Monilinia* spp. *Eur J Plant Pathol* 154, 305–318. <https://doi.org/10.1007/s10658-018-01657-z>
- Gijzen, M., Nürnberger, T., 2006. Nep1-like proteins from plant pathogens: Recruitment and diversification of the NPP1 domain across taxa. *Phytochemistry* 67, 1800–1807. <https://doi.org/10.1016/J.PHYTOCHEM.2005.12.008>
- Huang, X., Zhang, R., Qiu, Y., Wu, H., Xiang, Q., Yu, X., Zhao, K., Zhang, X., Chen, Q., Penttinen, P., Gu, Y., 2020. RNA-seq Profiling Showed Divergent Carbohydrate-Active Enzymes (CAZymes) Expression Patterns in *Lentinula edodes* at Brown Film Formation Stage Under Blue Light Induction. *Front Microbiol* 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01044>
- Idnurm, A., Crosson, S., 2009. The photobiology of microbial pathogenesis. *PLoS Pathog*. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000470>
- Igbalajobi, O., Yu, Z., Fischer, R., 2019. Red-and Blue-Light Sensing in the Plant Pathogen *Alternaria alternata* Depends on Phytochrome and the White-Collar Protein LreA.

- Kim, H.K., Lee, S., Jo, S.M., McCormick, S.P., Butchko, R.A.E., Proctor, R.H., Yun, S.H., 2013. Functional Roles of *FgLaeA* in Controlling Secondary Metabolism, Sexual Development, and Virulence in *Fusarium graminearum*. PLoS One 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068441>
- Kreidl, S., Edwards, J., Villalta, O.N., 2015. Assessment of pathogenicity and infection requirements of *Monilinia* species causing brown rot of stone fruit in Australian orchards. Australasian Plant Pathology 44, 419–430. <https://doi.org/10.1007/s13313-015-0362-7>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K., 2018. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. Mol Biol Evol 35, 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Lee, M.H., Bostock, R.M., 2006. Induction, regulation, and role in pathogenesis of appressoria in *Monilinia fructicola*. Phytopathology 96, 1072–1080. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-96-1072>
- Lee, M.-H., Chiu, C.-M., Roubtsova, T., Chou, C.-M., Bostock, R.M., 2010. Overexpression of a Redox-Regulated Cutinase Gene, *MfCUT1*, Increases Virulence of the Brown Rot Pathogen *Monilinia fructicola* on *Prunus* spp. Mol Plant Microbe Interact 23, 176–186. <https://doi.org/10.1094/MPMI>
- Liao, H.L., Alferez, F., Burns, J.K., 2013. Assessment of blue light treatments on citrus postharvest diseases. Postharvest Biol Technol 81, 81–88. <https://doi.org/10.1016/J.POSTHARVBIO.2013.02.019>
- Louise Glass, N., Schmoll, M., Cate, J.H.D., Coradetti, S., 2013. Plant cell wall deconstruction by ascomycete fungi. Annu Rev Microbiol 67, 477–498. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092611-150044>
- Mooney, J.L., Yager, L.N., 1990. Light is required for conidiation in *Aspergillus nidulans*. Genes Dev 4, 1473–1482.
- Nakajima, M., Akutsu, K., 2014. Virulence factors of *Botrytis cinerea*. Journal of General Plant Pathology. <https://doi.org/10.1007/s10327-013-0492-0>
- Pelloux, J., Rustérucci, C., Mellerowicz, E.J., 2007. New insights into pectin methylesterase structure and function. Trends Plant Sci 12, 267–277. <https://doi.org/10.1016/J.TPLANTS.2007.04.001>
- Peñalva, M.A., Tilburn, J., Bignell, E., Arst, H.N., 2008. Ambient pH gene regulation in fungi: making connections. Trends Microbiol 16, 291–300. <https://doi.org/10.1016/J.TIM.2008.03.006>
- Pérez-Lara, G., Olivares-Yañez, C., van Bakel, H., Larrondo, L.F., Canessa, P., 2023. Genome-Wide Characterization of Light-Regulated Gene Expression in *Botrytis cinerea* Reveals Underlying Complex Photobiology. Int J Mol Sci 24. <https://doi.org/10.3390/ijms24108705>

- Pirc, K., Albert, I., Nürnberger, T., Anderluh, G., 2023. Disruption of plant plasma membrane by NEP1-like proteins in pathogen–plant interactions. *New Phytologist*. <https://doi.org/10.1111/nph.18524>
- Pirc, K., Hodnik, V., Snoj, T., Lenarčič, T., Caserman, S., Podobnik, M., Böhm, H., Albert, I., Kotar, A., Plavec, J., Borišek, J., Damuzzo, M., Magistrato, A., Brus, B., Sosič, I., Gobec, S., Nürnberger, T., Anderluh, G., 2021. NEP1-like proteins as a target for plant pathogen control. *PLoS Pathog* 17. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009477>
- R. Hall, 1971. Pathogenicity of *Monilinia fructicola*. *Phytopath. Z* 72, 281–290.
- Rasiukevičiūtė, N., Brazaitytė, A., Vaštakaitė-Kairienė, V., Kupčinskienė, A., Duchovskis, P., Samuolienė, G., Valiuškaitė, A., 2021. The effect of monochromatic LED light wavelengths and photoperiods on *Botrytis cinerea*. *Journal of Fungi* 7. <https://doi.org/10.3390/jof7110970>
- Reignault, P., Valette-Collet, O., Boccara, M., 2008. The importance of fungal pectinolytic enzymes in plant invasion, host adaptability and symptom type. *Eur J Plant Pathol*. <https://doi.org/10.1007/s10658-007-9184-y>
- Rodríguez-Pires, S., Espeso, E.A., Baró-Montel, N., Torres, R., Melgarejo, P., De Cal, A., 2019. Labeling of *Monilinia fructicola* with GFP and its validation for studies on host-pathogen interactions in stone and pome fruit. *Genes (Basel)* 10. <https://doi.org/10.3390/genes10121033>
- Rodríguez-Pires, S., Espeso, E.A., Rasiukevičiūtė, N., Melgarejo, P., De Cal, A., 2021a. Light-photoreceptors and proteins related to *Monilinia laxa* photoresponses. *Journal of Fungi* 7, 1–17. <https://doi.org/10.3390/jof7010032>
- Rodríguez-Pires, S., Garcia-Companys, M., Espeso, E.A., Melgarejo, P., de Cal, A., 2021b. Influence of light on the *Monilinia laxa*–stone fruit interaction. *Plant Pathol* 70, 326–335. <https://doi.org/10.1111/ppa.13294>
- Rodríguez-Pires, S., Melgarejo, P., De Cal, A., Espeso, E.A., 2020a. Proteomic Studies to Understand the Mechanisms of Peach Tissue Degradation by *Monilinia laxa*. *Front Plant Sci* 11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01286>
- Rodríguez-Pires, S., Melgarejo, P., De Cal, A., Espeso, E.A., 2020b. Pectin as carbon source for *Monilinia laxa* exoproteome and expression profiles of related genes. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 33, 1116–1128. <https://doi.org/10.1094/MPMI-01-20-0019-R>
- Rungjindamai, N., Jeffries, P., Xu, X.M., 2014. Epidemiology and management of brown rot on stone fruit caused by *Monilinia laxa*. *Eur J Plant Pathol*. <https://doi.org/10.1007/s10658-014-0452-3>
- Santhanam, P., Van Esse, H.P., Albert, I., Faino, L., Nürnberger, T., Thomma, B.P.H.J., 2013. Evidence for functional diversification within a fungal NEP1-like protein family. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 26, 278–286. <https://doi.org/10.1094/MPMI-09-12-0222-R>

- Schmidt-Heydt, M., Parra, R., Geisen, R., Magan, N., 2011. Modelling the relationship between environmental factors, transcriptional genes and deoxynivalenol mycotoxin production by strains of two *Fusarium* species. *J R Soc Interface* 8, 117–126. <https://doi.org/10.1098/rsif.2010.0131>
- Schmittgen, T.D., Livak, K.J., 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat Protoc* 3, 1101–1108. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>
- Schmoll, M., 2018. Regulation of plant cell wall degradation by light in *Trichoderma*. *Fungal Biol Biotechnol*. <https://doi.org/10.1186/s40694-018-0052-7>
- Schmoll, M., Tian, C., Sun, J., Tisch, D., Glass, N.L., 2012. Unravelling the molecular basis for light modulated cellulase gene expression - the role of photoreceptors in *Neurospora crassa*. *BMC Genomics* 13. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-127>
- Schumacher, J., 2017. How light affects the life of *Botrytis*. *Fungal Genetics and Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2017.06.002>
- Schumacher, J., Pradier, J.M., Simon, A., Traeger, S., Moraga, J., Collado, I.G., Viaud, M., Tudzynski, B., 2012. Natural Variation in the VELVET Gene *bcvell1* Affects Virulence and Light-Dependent Differentiation in *Botrytis cinerea*. *PLoS One* 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047840>
- Tisch, D., Kubicek, C.P., Schmoll, M., 2011. The phosducin-like protein PhLP1 impacts regulation of glycoside hydrolases and light response in *Trichoderma reesei*. *BMC Genomics* 12. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-613>
- Trzaska, W.J., Wrigley, H.E., Thwaite, J.E., May, R.C., 2017. Species-specific antifungal activity of blue light. *Sci Rep* 7. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05000-0>
- Verde-Yáñez, L., Vall-llaura, N., Usall, J., Teixidó, N., Torres, R., 2022. Phenotypic plasticity of *Monilinia* spp. in response to light wavelengths: From in vitro development to virulence on nectarines. *Int J Food Microbiol* 373. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109700>
- Villarino, M., Egüen, B., Lamarca, N., Segarra, J., Usall, J., Melgarejo, P., De Cal, A., 2013. Occurrence of *Monilinia laxa* and *M. fructigena* after introduction of *M. fructicola* in peach orchards in Spain. *Eur J Plant Pathol* 137, 835–845. <https://doi.org/10.1007/s10658-013-0292-6>
- Villarino, M., Rodríguez-Pires, S., Requena, E., Melgarejo, P., De Cal, A., Espeso, E.A., 2022. A Secondary Metabolism Pathway Involved in the Production of a Putative Toxin Is Expressed at Early Stage of *Monilinia laxa* Infection. *Front Plant Sci* 13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.818483>
- Wang, G.Y., Michailides, T.J., Hammock, B.D., Lee, Y.M., Bostock, R.M., 2000. Affinity Purification and Characterization of a Cutinase from the Fungal Plant Pathogen *Monilinia fructicola* (Wint.) Honey. *Arch Biochem Biophys* 382, 31–38. <https://doi.org/10.1006/ABBI.2000.1995>

- Xie, C., Gong, W., Zhu, Z., Yan, L., Hu, Z., Peng, Y., 2018. Comparative transcriptomics of *Pleurotus eryngii* reveals blue-light regulation of carbohydrate-active enzymes (CAZymes) expression at primordium differentiated into fruiting body stage. *Genomics* 110, 201–209. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2017.09.012>
- XU, H., FU, Y. nan, LI, T. lai, WANG, R., 2017. Effects of different LED light wavelengths on the resistance of tomato against *Botrytis cinerea* and the corresponding physiological mechanisms. *J Integr Agric* 16, 106–114. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(16\)61435-1](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(16)61435-1)
- Yang, C., Li, W., Huang, X., Tang, X., Qin, L., Liu, Y., Xia, Y., Peng, Z., Xia, S., 2022. SsNEP2 Contributes to the Virulence of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Pathogens* 11. <https://doi.org/10.3390/pathogens11040446>
- Zaparoli, G., Barsottini, M.R.D.O., De Oliveira, J.F., Dyszy, F., Teixeira, P.J.P.L., Barau, J.G., Garcia, O., Costa-Filho, A.J., Ambrosio, A.L.B., Pereira, G.A.G., Dias, S.M.G., 2011. The crystal structure of necrosis- and ethylene-inducing protein 2 from the causal agent of cacao's witches' broom disease reveals key elements for its activity. *Biochemistry* 50, 9901–9910. <https://doi.org/10.1021/bi201253b>